

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Buněčná a vývojová biologie

Specializace: Fyziologie buňky



**Tereza Nedvěďová**

Mezibuněčné interakce v maligním melanomu

Intercellular interactions in malignant melanoma

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Barbora Dvořánková, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Ondřej Kodet

Anatomický ústav 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Praha, 2014

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2014

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla vyjádřit obrovský a vřelý dík RNDr. B. Dvořánkové, Ph.D. a MUDr. O. Kodetovi za odborné vedení mé práce – za pomoc ve všech aspektech výzkumného procesu, za neskonalou trpělivost a také za čas, kterého mi během svých mnohých povinností tolik věnovali.

Moje díky patří také prof. MUDr. K. Smetanovi, Jr., DrSc. za důvěru, kterou ve mě měl a se kterou mi umožnil vypracování předkládané diplomové práce ve své laboratoři. Nechci zapomenout ani navšechny ostatní členy této laboratoře Anatomického ústavu, kteří mi kdykoli poskytli pomoc a cenné rady a zároveň vytvořili přátelské prostředí, ve kterém byla radost pracovat.

Nemůžu opomenout ani doc. RNDr. O. Nedvěda, Ph.D., kterému vděčím za rady z oblasti formálních náležitostí, a také celou svoji rodinu a přátele, kteří tolerovali moji zaneprázdněnost, podporovali mě a celé to se mnou vydrželi, za což jim patří moje velká poklona.

Práce byla financována z prostředků GAČR 204/12/1333 a PRVOUK 27-1.

## OBSAH

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Klíčová slova .....	3
Seznam zkratk.....	3
1. Literární přehled.....	5
1.1. Úvod .....	5
1.1.1. Struktura a funkce kůže .....	6
1.1.2. Minoritní buněčné zastoupení v epidermis .....	8
1.1.3. Původ melanocytů .....	9
1.1.4. Základní funkce a vlastnosti melanocytů .....	10
1.1.5. Specifické znaky melanocytů.....	12
1.2. Melanom .....	13
1.2.1. Diagnostika melanomu .....	14
1.2.2. Genetika melanomu .....	16
1.2.3. Léčba melanomu a nové trendy .....	17
1.3. Nádorové stroma .....	19
1.3.1. Složení a vznik nádorového stromatu.....	19
1.3.2. Stromální fibroblasty .....	22
1.3.2.1. Původ stromálních fibroblastů.....	23
1.3.2.2. Význam a funkce stromálních fibroblastů .....	24
1.4. Fenotyp nádorových melanocytů a jejich buněčné interakce .....	27
2. Cíle diplomové práce .....	30
3. Metody .....	31
3.1. Obecná část .....	31
3.1.1. Použitá média a roztoky.....	31
3.1.2. Použité buňky.....	32
3.1.3. Tkáňové kultury .....	34
3.1.3.1. Kultivace buněk.....	34
3.1.3.2. Pasážování buněk.....	35
3.1.3.3. Příprava skel pro imunohistochemickou detekci .....	35
3.1.3.4. Zamrazování a rozmrazování buněk.....	36
3.1.4. MTT test.....	36
3.1.5. Imunohistochemie.....	37
3.2. Provedení jednotlivých pokusů.....	39
3.2.1. Vliv neadhezivního prostředí a stromálních fibroblastů na fenotyp buněk různých melanomových linií.....	39
3.2.2. Srovnání růstového potenciálu, metabolické aktivity a produkce extracelulární matrix různých typů fibroblastů samotných a pod vlivem nádorových buněk .....	40
3.2.2.1. Sledování růstu buněk .....	41
3.2.2.2. Stanovení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu .....	41

3.2.2.3. Sledování produkce extracelulární matrix v intervalu 7 a 21 dní.....	41
3.2.3. Sledování růstového potenciálu, tvorby extracelulární matrix a přechodu v myofibroblasty různých stromálních fibroblastů z melanomu - indukce vlivem kondiciovaných médií ze zdravých a nádorových melanocytů .....	42
4. Výsledky .....	44
4.1. Vliv neadhezivního prostředí a stromálních fibroblastů na fenotyp buněk různých melanomových linií .....	44
4.2. Srovnání růstového potenciálu, metabolické aktivity a produkce extracelulární matrix různých typů fibroblastů samotných a pod vlivem nádorových buněk .....	53
4.3. Sledování růstového potenciálu, tvorby extracelulární matrix a přechodu v myofibroblasty různých stromálních fibroblastů z melanomu - indukce vlivem kondiciovaných médií ze zdravých a nádorových melanocytů .....	62
5. Diskuze .....	77
5.1. Indukce kmenových znaků u melanomových linií.....	77
5.2. Sledování možného uniformního chování CAFs z různých typů kožních nádorů .....	80
5.3. Studium vlivu různých nádorových melanocytů na CAFs z různých melanomů.....	84
6. Závěry .....	87
7. Použitá literatura.....	88

## ABSTRAKT

Melanom reprezentuje jeden z nejagresivnějších nádorů s velmi vysokou tendencí k metastazování do prakticky jakýchkoli lokalit, se stoupající incidencí a vysokou mortalitou. Účelem mé diplomové práce bylo zkoumat tento nádor jako komplexní strukturu, která vedle nádorových buněk obsahuje i nádorové stroma. Buňky stromatu jsou pro existenci nádorů zásadní, což je již dobře zdokumentováno např. u epitelových nádorů hlavy a krku. Podobné mechanismy lze očekávat i v melanomu.

V první části své diplomové práci jsme simulovali metastazaci nádoru za *in vitro* podmínkách. Zkoumali jsme vliv neadhezivního prostředí, ať samotného, či kombinovaného s vlivem stromálních fibroblastů, na fenotyp nádorových buněk. Získaná data dokládají, že nádorové melanocyty mohou v těchto podmínkách měnit svůj fenotyp, což ukazuje na jejich možnou plasticitu ale současně na zásadní vliv stromálních fibroblastů na nádorové buňky. Jednotlivé linie se mezi sebou liší, což odpovídá známé heterogenitě melanomů v klinické praxi.

V naší laboratoři bylo dříve zjištěno, že stromální fibroblasty z různých typů tumorů mají univerzální účinky na nádorové buňky. V druhé části naší studie jsme naopak zkoumali, jak ovlivňují nádorové buňky stromální fibroblasty a zda je toto ovlivnění nádorově specifické. Sledovali jsme růst, metabolickou aktivitu a produkci extracelulární matrix stromálních fibroblastů, ovlivněných různými nádorovými buňkami. Zjistili jsme, že působení různých nádorových buněk není jednotné a fenotyp fibroblastů se pod vlivem jednotlivých melanomových linií výrazně liší. Získané výsledky tedy ukazují na velkou vzájemnou provázanost nádorových buněk a stromálních fibroblastů a na jejich schopnost vzájemně ovlivňovat svůj fenotyp.

Předložená diplomová práce ukazuje, jak kultivační podmínky mohou ovlivnit fenotyp nádorových melanocytů i stromálních fibroblastů. Pochopení role epitelově mezenchymových interakcí v melanomu může přispět k rozvoji personalizované léčby melanomu.

## ABSTRACT

Melanomas are one of the most aggressive types of tumours, with increasing incidence, high mortality and high potential to metastasize to a variety of diverse locations. The aim of this thesis was to study the tumour as a complex structure consisting not only of tumour cells but also of tumour stroma. Stromal cells play a major role in cancer biology. This is well documented for example in squamous cell epithelium tumours of the head and neck. Similar mechanisms can be expected to occur in melanomas.

In the first experiment, we simulated the conditions *in vivo* during the metastatic process and studied the influence of non-adhesive environment both with and without the influence of stromal fibroblasts. The presented data demonstrates a change of tumour cells' phenotype leading to increased plasticity of the melanoma cells in these conditions. It also indicates the crucial role of stromal fibroblasts in interactions with melanoma cells. Cancer cell lines show variability in their behaviour, which is in accordance with well-known melanoma heterogeneity in clinical practice.

The previous experiments in our laboratory indicate that cancer associated fibroblasts are able to influence the phenotype of a tumour cell line and this effect is based on a tumour type-unspecific mechanism. In the second part of our study we focused on the influence of tumour cells on stromal fibroblasts and the fibroblasts' response. The aim was to determine whether this effect is specific or not. We studied the growth, metabolic activity and the production of extracellular matrix by stromal fibroblasts under the influence of various cancer cells. The experiment shows that different types of melanoma cells affected stromal fibroblasts differently and the fibroblast lines' behaviour varied under the same cultivation conditions. These results indicate the tight relationship between tumour cells and stromal fibroblasts and their ability to modify their phenotype through mutual cell interactions.

The submitted thesis shows how the phenotype of both melanoma cells and cancer associated fibroblasts can be modified in different culture conditions. The better understanding of epithelial mesenchymal interactions in melanoma can contribute to further development of new personalized therapies.

## KLÍČOVÁ SLOVA

melanom, stromální fibroblasty, nádorové mikroprostředí, epitelově mezenchymové interakce, nádorové stroma, plasticita nádorových buněk, myofibroblasty, biologická léčba

## KEYWORDS

melanoma, stromal fibroblasts, tumor microenvironment, epithelial-mesenchymal interactions, tumor stroma, tumor cell plasticity, myofibroblasts, targeted therapy

## SEZNAM ZKRATEK

ALM – akrálně lentiginózní melanom

CAFs – nádorově asociované fibroblasty, též stromální fibroblasty

CEE – kuřecí embryonální extrakt

CSCs – nádorové kmenové buňky

CXCR-4: chemokinový receptor 4

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenylindol

DMSO – dimetylsulfoxid

ECM – extracelulární matrix

EDTA – etylendiamin-tetraoctová kyselina

EGF – epidermální růstový faktor

EMT – epitelově mezenchymový přechod

FBS – fetální hovězí sérum

FGF – fibroblastový růstový faktor

FITC - fluorescein isothiokyanát

GM-SCF - granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor

hESC- lidské embryonální kmenové buňky

HF – zdravé dermální fibroblasty

HGF – hepatocytový růstový faktor

hMSC – lidské mezenchymové kmenové buňky

IFN  $\alpha$  – interferon  $\alpha$

IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor

IL-8 – interleukin 8

MAPK – mitogenem aktivovaná kináza



MiTF – mikroftalmický transkripční faktor  
MMP2 – metaloproteáza 2  
NM – nodulární melanom  
PBS – fosfátový pufr  
PDGF – destičkový růstový faktor  
PI3K – fosfoinosid-3 kináza  
Pmel – melanozomální matrixový protein  
SCID – těžká kombinovaná imunodeficience  
SDF-1/CXCL12 – stromálními buňkami produkováný faktor 1  
SLN – sentinelová uzlina  
SSM – povrchově se šířící melanom  
TGF- $\beta$  – nádorový růstový faktor  $\beta$   
TRITC - tetrametylrodamin-isothiokyanát  
TYR – tyrozináza  
TYRP1,2 – tyrozináze příbuzný protein 1, 2  
UV – ultrafialové záření  
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor  
 $\alpha$ -SMA – alfa svalový aktin

# **1. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## **1.1. ÚVOD**

Nádorová onemocnění mají přes mnohé pokroky v jejich léčbě stoupající incidenci a představují tak komplexní problém celosvětové úrovně. Tato skutečnost vede k velkému zájmu o podrobné studium patogeneze nádorů, ke snaze o časnou a jasnou diagnostiku a také o vývoj nových léčebných strategií. Výzkumná zaměření se přesouvají na porozumění mechanismu vzniku nádoru, komplexitu nádoru s mezibuněčnými interakcemi a procesy vedoucí k metastazování.

Melanom je nádor vycházející z melanocytů, minoritní populace buněk uložených v bazální vrstvě epidermis. Melanocyty jsou odvozeny z buněk s vysokým migračním potenciálem a schopnost migrace si do určité míry zachovávají i postnatálně. Porucha homeostatických mechanismů zajišťujících souhru mezi proliferací a zánikem těchto buněk může vysvětlovat velkou agresivitu nádorových melanocytů. Melanom má více histologických typů a je známý svou nevypočitatelnou progresí a také metastazováním prakticky do jakýchkoli orgánů. Jeho prognóza je ve stádiu metastáz velmi špatná. Pochopení mechanismů regulujících funkci melanocytů za fyziologických i patologických situací může přispět k objasnění vývoje melanomu.

Předložená diplomová práce vznikla na půdě Anatomického ústavu 1. LF UK v laboratoři profesora Karla Smetany, která se dlouhodobě zabývá biologií nádorů a zejména buněčnými interakcemi podílejícími se na nádorovém bujení. Některé mechanismy hrající roli v progresi nádorových onemocnění mají své místo i v běžně probíhajících fyziologických procesech. Epitelově mezenchymové interakce, které jsou významné pro nádory vycházející z buněk dlaždicových epitelů, mají důležitou roli při vývoji tkání v zárodečném stadiu i postnatálně. Rozdíly mezi těmito mechanismy v jejich fyziologické a patologické roli jsou minimální a ukazuje se, že mohou být dány spíše kontextem okolních buněk.

Nezbytným předpokladem studia buněčných interakcí a změn výstavby tkání při nádorovém bujení a jeho progresi je důkladná znalost struktury a fyziologické funkce tkání. Pro pochopení melanomu a jeho mikroprostředí v širším kontextu je tedy důležité znát morfolonii kůže a funkci jejích složek.

### 1.1.1. Struktura a funkce kůže

Kůže je považována za největší orgán lidského těla, její plocha se pohybuje od 1,5 do 2 m<sup>2</sup> a její hmotnost dosahuje okolo jedné pětiny celkové hmotnosti lidského těla. Skládá se ze tří hlavních součástí, kterými jsou *epidermis* (pokožka), *dermis* (škára) a *tela subcutanea* (podkožní vazivo). Tvoří první linii v obraně těla před zevními vlivy prostředí, což je jedna z jejích hlavních funkcí. Kůže nezajišťuje pouze mechanickou bariéru, důležitá je i jako bariéra chemická, je totiž málo propustná pro hydrofilní látky díky mazu produkovanému kožními žlázami. Maz se dostává na povrch, impregnuje ji a slouží zde i jako bariéra proti mikroorganismům, jelikož společně s produkovaným potem obsahuje důležité antibakteriální látky. Antimikrobiálně působí i kyselé pH pohybující se v hodnotách 4–6. Imunitní odpověď zabezpečují specializované dendritické Langerhansovy buňky, lymfocyty a makrofágy vyskytující se v hlubších vrstvách pokožky. Velmi zásadní je funkce kůže v ochraně před ultrafialovým zářením (UV), která je zajištěna pomocí melaninu produkovaného melanocyty a transportovaného do okolních keratinocytů (Lullmann-Rauch, 2012).

Kůže má v základním rozdělení dvojí původ. Epidermis, povrchová vrstva je původem z ektodermu, zatímco dermis vývojově pochází z mezenchymu. Epidermis, jejíž spodní hranici jsou výběžky koria, je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem. V konečném uspořádání se skládá z vrstev postupně diferencujících se keratinocytů (Fuchs, 2007).

Spodní vrstva keratinocytů je připojena k bazální membráně, která tvoří rozhraní mezi epitelem a pojivovou tkání pod ním. Spoje mezi keratinocyty a bazální membránou jsou zajištěny pomocí hemidesmozomů, které jsou tvořeny transmembránovými adhezivními molekulami nazývanými integriny. Základní komponentou bazální membrány je kolagen typu IV a glykoprotein laminin. Kolagen je především stabilizující složkou odolnou na mechanické vlivy (Lullmann-Rauch, 2012). Laminin je protein objevující se v časných stádiích embryonálního období a je důležitý pro vývoj epitelů. Hraje též roli v nádorové biologii. Interakce nádorových buněk s lamininem byla popsána jako jeden z důležitých dějů v procesu invaze a metastazování tumoru (Givant-Horwitz et al., 2005). Dalšími složkami bazální membrány jsou perlecan nebo nidogen, který zprostředkovává kontakt mezi komponentami bazální membrány a složkami okolní extracelulární matrix (ECM; Breitkreutz et al., 2013). Pomocí elektronového mikroskopu lze rozeznat dvě části bazální membrány. *Lamina lucida* leží blíže epitelu a je spojena s bazální vrstvou keratinocytů jemnými vlákny

kotvících filament kolagenu typu XVII, které stabilizují komplexy hemidesmozomů (Powell et al., 2005). Druhá část přiléhající se svrchu k *dermis* se označuje *lamina densa*. Této oblasti se říká dermoepidermální junkce a její pevnost je zajištěna takzvanými kotvícími fibrilami tvořenými kolagenem typu VII (Regauer et al., 1990).

Epidermis je vrstevnatý dlaždicový epitel, ve kterém rozeznáváme několik specifických vrstev. Na bazální membránu naléhá tzv. *stratum basale*, která je tvořena jednou vrstvou keratinocytů cylindrického tvaru, charakterizovaných velkým jádrem a malým množstvím cytoplazmy. Tyto buňky zajišťují obnovu vyšších vrstev a jsou charakterizované expresí keratinu-5 a keratinu-14 (Coulombe et al., 1989). Od bazální vrstvy, kde nacházíme nejméně diferencované buňky, dochází směrem na povrch k postupné diferenciaci až jaderné pyknóze. Buňky další vrstvy, *stratum spinosum*, jsou spojené pomocí desmozomů, které se v mikroskopu jeví jako ostnité výběžky, a jejich typickou charakteristikou je polygonální tvar (Lullmann-Rauch, 2012). V této vrstvě již dochází k terminální diferenciaci a dochází i ke ztrátě exprese keratinu-5 a keratinu-14 (Coulombe et al., 1989). V následující vrstvě *stratum granulosum* se buňky oplošťují a objevují se v nich hrubá zrnka keratohyalinu tvořící meziprodukt rohovění, která jsou odpovědná za název této vrstvy. *Stratum lucidum* je tenká vrstva, ve které probíhá přeměna keratohyalinu na eleidin a glykogen. Nacházíme ji pouze v tzv. tlustém typu kůže, tedy například na ploskách nohou a na dlaních (Lullmann-Rauch, 2012). Nejsvrchnější vrstva se nazývá *stratum corneum*. Je tvořena několika vrstvami oploštělých bezjaderných buněk a její horní vrstva se v epidermis na rozdíl od sliznic pravidelně olupuje. Celý proces postupné diferenciaci od bazální vrstvy k vrstám povrchovým trvá asi 28 dní (Štork, 2007). V epidermis se kromě keratinocytů nachází i další buňky, tzv. minoritní buněčné populace, které sehrávají významnou úlohu v homeostatických mechanismech epidermis a celé kůže (viz kapitola 1.2.).

Dermis, jak již bylo zmíněno, má na rozdíl od epidermis původ mezenchymální, konkrétně v dermatomech somitů, mezodermu laterální ploténky a ektomezenchymu, který osidluje oblast budoucí hlavy a krku. Povrchová vrstva, *pars papillaris*, vytváří směrem do epidermis dermální papily. Papily jsou více vytvořeny na místech, kde dochází k výraznějším mechanickým vlivům na kůži. Pod touto vrstvou se nachází *pars reticularis* a v hloubi potom *tela subcutanea*, tedy podkožní vazivo taktéž z mezenchymu (Lullmann-Rauch, 2012). Dermis je tvořena z části mezibuněčnou hmotou (ECM) a z části buňkami.

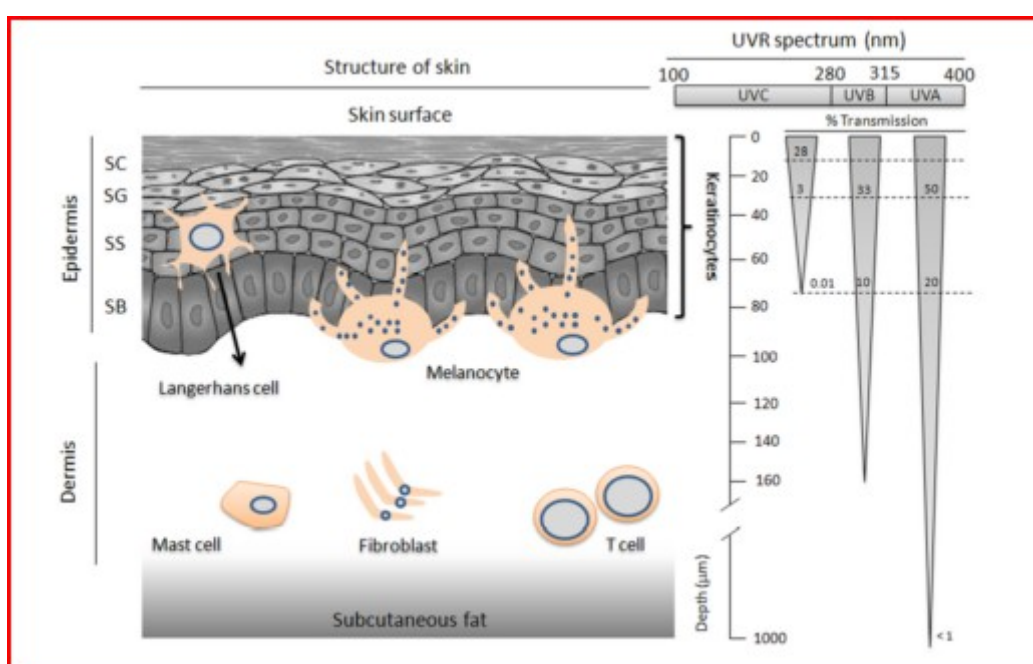
Mezi buňky vyskytující se v dermis můžeme řadit buňky imunitního systému, především histiocyty a mastocyty. Hlavní buněčnou složkou dermis jsou ale fibroblasty. Zajišťují produkci i přestavbu ECM tvořící dermis. Zároveň se také podílí na tvorbě bazální membrány (Breitkreutz et al., 2013). Fibroblasty jsou ale také dynamickou komponentou produkující řadu signálních molekul v podobě cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, čímž jsou schopny ovlivnit např. okolní keratinocyty v podobě tzv. epitelově mezenchymových interakcí (Werner et al., 2007). Pojem „dermální fibroblasty“ je značným zjednodušením, fibroblasty v rámci dermis mají totiž rozdílné vlastnosti, což je také potřeba brát v úvahu při experimentech užívajících dermální fibroblasty (Sorrell et Caplan, 2004). Kůže dospělého člověka obsahuje nejméně tři rozdílné subpopulace fibroblastů okupující rozdílná místa v dermis. Jsou jimi fibroblasty obývající papilární část dermis, retikulární dermis a nakonec také fibroblasty formující dermální papily vlasových folikulů. Jednotlivé subpopulace se neliší pouze lokalizací, ale i produkcí rozdílných autokrinně a parakrinně působících faktorů do svého okolí – fibroblasty z papilární vrstvy dermis produkovaly více granulocytárního makrofágového kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF) a keratinocytového růstového faktoru (KGF) než fibroblasty z retikulární vrstvy (Sorrell et al., 2004). Fibroblasty formující dermální papily vlasových folikulů se účastní intenzivních epitelově mezenchymových interakcí, kde se vzájemně ovlivňují s keratinocyty formujícími vlasový bulbus. Tyto interakce udržují dynamickou rovnováhu tkáně organismu prenatálně, postnatálně, ale i při cyklických obměnách kožních adnex. Ve vlasovém folikulu hrají fibroblasty roli inhibiční a stabilizační a umožňují tak cyklickou obnovu vlasových folikulů (Botchkarev et Kishimoto, 2003; Fuchs, 2007).

### 1.1.2. Minoritní buněčné zastoupení v epidermis

Jak už bylo zmíněno výše, v epidermis nacházíme i jiné buněčné populace než pouze keratinocyty. Jedním z těchto buněčných typů jsou Langerhansovy buňky, což jsou dendritické antigen prezentující buňky. Vyvíjí se v kostní dřeni podobně jako ostatní buňky imunitního systému a dokáží vázat antigeny a vyvolat tak následně specifickou buněčnou odpověď (Schuster et al., 2014). Další specializovanou buněčnou populací jsou tzv. Merkelovy buňky. Jsou lokalizovány v bazální vrstvě epidermis a v cytoplasmě obsahují charakteristická neurosekreční granula. Většina prací se jednoznačně přiklání k jejich původu z neurální lišty, která byla dokumentována vložení transgenů do buněk neurální lišty a

posléze sledována jeho exprese v Merkelových buňkách (Szeder et al., 2003). Některé vlastnosti, například přítomnost cytokeratinů v cytoplasmě, svědčí ovšem spíše pro epidermální původ (Moll et al., 1995). Merkelovy buňky jsou synapticky spojeny axony nervových buněk – fungují jako mechanoreceptory – a mohou mít navíc určité endokrinní funkce (Lucarz and Brand, 2007).

Další minoritní populaci buněk epidermis tvoří melanocyty, což jsou také buňky neuroektodermálního původu. Do pokožky migrují v embryonálním období poté, co se uvolní při uzavěru neurální trubce procesem zvaným epitelově mezenchymový přechod (EMT); (Cichorek et al., 2013). Vývoj melanocytů je podrobněji popsán v následující kapitole.



Obr. 1 (přejato z Lee et al., 2013): Struktura kůže a průchod UV jednotlivými vrstvami. Melanocyty jsou lokalizovány v bazální vrstvě epidermis a syntetizují melanin. Langerhansovy antigen prezentující buňky jsou lokalizovány ve středních vrstvách epidermis. UVC je záření s nejvyšší energií, ale většina je zachycena ozonovou vrstvou. UVB je záření se střední energií a preferenčně napadá buněčnou DNA. UVA je záření s nejnižší energií, ale je schopno penetrace hluboko do pokožky.

### 1.1.3. Původ melanocytů

Neurální lišta je přechodná embryonální tkáň, jejíž multipotentní buňky migrují do různých částí těla a ve své cílové struktuře se diferencují v závislosti na signálech z okolního prostředí. Z neurální lišty pochází buňky mnoha různých typů a funkcí, například neurony a glie periferního nervového systému, buňky chrupavek a kostí v kraniofaciální oblasti (Cooper et

Raible, 2009). Relativně dobře je zdokumentován právě vývoj melanocytů, které produkují pigment v těle. Budoucí melanocyty migrují z neurální lišty na periferii do cílových orgánů v průběhu druhého měsíce embryonálního vývoje skrze vyvíjející se mezenchym. Během migrace podstupují EMT, díky kterému se tyto buňky delaminují od uzavírající se neurální trubice, a následně migrují do okolního mezodermu (Thiery et al., 2009). Na řízení migrace buněk odvozených z neurální lišty do cílových orgánů se podílí např. Wnt signalizace (Carmona-Fontaine et al., 2008). Zásadní roli v EMT hraje snížení exprese E-cadherinu, což je adhezivní molekula vyskytující se na membránách většiny epitelových buněk. Regulace exprese E-cadherinu je zajištěna komplexním souborem signálních drah. Centrální kaskádou se zdá být PI3K/AKT signální dráha, která při aktivaci přímo umlčuje transkripci genu pro E-cadherin. AKT působí na zvýšení exprese transkripčního faktoru Snail, který poté znemožňuje transkripci E-cadherinu (Larue et Bellacosa, 2005).

Pro patřičný vývoj melanocytů je tedy EMT klíčová, protože vlastnosti mezenchymových buněk jim propůjčí migrační fenotyp. Po ukončení migrace získávají naopak melanocyty vlastnosti epitelových buněk zpět a plní v daných tkáních svou funkci. V této souvislosti se hodí poznamenat, že E-cadherin hraje u epitelových buněk *de facto* roli tumor supresorového genu, jelikož inhibuje invazi a metastazování, a během nádorové transformace je velmi často degradován. V melanomu je běžně nacházena kombinace snížení exprese E-cadherinu a zvýšení exprese N-cadherinu, což podporuje dermální a vaskulární invazi nádorově transformovaných melanocytů (Smalley et al., 2005; Haass et Herlyn, 2005; Thiery et al., 2009; Lade-Keller et al., 2013).

#### 1.1.4. Základní funkce a vlastnosti melanocytů

Hlavní funkcí melanocytů je tvorba melaninu, který pomocí svých výběžků transportují do okolních keratinocytů. Diferencované melanocyty jsou tedy charakterizovány schopností produkce melaninu, který je skladován v melanozomech – specializovaných organelách, kde je pigment akumulován a transportován buněčnými výběžky. Produkce a akumulace melaninu zahrnuje několik nezbytných enzymů včetně tyrozinázy, která se používá i jako jeden ze základních markerů melanocytů (Cooper et Raible, 2009). Dendritická morfologie není pro melanocyty unikátní, ale je důležitá pro jejich funkci. Lidské melanocyty produkují melanozomy a předávají je keratinocytům v reakci na sluneční záření právě pomocí dendritických výběžků. Melanin napomáhá obraně keratinocytů před poškozením DNA UV

zářením (Lee et al., 2013). Jeden melanocyt takto zásobuje přibližně 36 keratinocytů v bazálních a suprabazálních vrstvách epidermis. Tento anatomický vztah mezi keratinocyty a melanocyty je znám jako tzv. epidermální melanocytární jednotka (Haass et Herlyn, 2005). V mikroskopu se diferencované melanocyty jeví jako oválné až dendritické buňky, které jsou menší než keratinocyty (Štork, 2007; Cichorek et al., 2013).

Pro bezchybnou syntézu a následnou distribuci melaninu jsou nezbytné přesně regulované děje. V první řadě se jedná o vývoj prekurzorových buněk – melanoblastů, které migrují do budoucí dermis, epidermis, vlasových folikulů, cévnatky oka, *stria vascularis* ucha a do měkkých plen mozkových (Brenner et Hearing, 2009).

Dalším krokem je diferenciaci melanoblastů v melanocyty. Potom, co melanoblasty domigrují do cílové struktury, diferencují se během šestého měsíce fetálního života, kdy se také formuje hranice mezi epidermis a dermis. Melanocytů v dermis během fetálního života ubývá a do narození jsou v podstatě nedetekovatelné. Naproti tomu melanocyty uložené v bazální vrstvě epidermis pokračují v proliferaci a začínají produkovat melanin (Costin et Hearing, 2007).

Melanin je produkován v melanozomech, specializovaných sekrečních organelách obalených jednovrstevnou membránou. Potřebná strukturální a enzymatická výbava pro tvorbu melaninu je do nich transportována z Golgiho cisteren (Costin et Hearing, 2007). Syntéza melaninu probíhá z aminokyseliny tyrozinu enzymatickou kaskádou. Pro melanocyty je specifická přítomnost tyrozinázy (TYR), tyrozináze příbuzného proteinu 1 a 2 (TYRP1, TYRP2), melanozomálních matrixových proteinů (Pmel17) a mikroftalmického transkripčního faktoru (MITF); (Watabe et al., 2008; Brenner et Hearing, 2009).

Pro přesné určení osudu buňky je důležitá integrace signálů, nejčastěji s aktivací transkripčního faktoru, který aktivuje dráhu dalších diferenciačních genů. Právě MITF je považován za klíčový regulátor pro ustanovení melanocytární linie. MITF je tedy nezbytným a zároveň dostatečným faktorem definujícím buňky jako melanocyty. Mutace genu pro MITF vede k široké škále defektů v pigmentaci (Cooper et Raible, 2009).

I malé změny v rámci intracelulárního prostředí ovlivní melanozomy a následně tedy i pigmentaci, pro kterou je potřeba nejen správné syntézy melaninu, ale navíc transport melanozomů do okolních keratinocytů. Počet melanocytů závisí na typu kůže, rase, ale i na



anatomické lokalizaci (v průměru asi 1200/mm<sup>2</sup>; Cichorek et al., 2013). Rasové rozdíly v pigmentaci kůže odráží navíc počet, velikost a způsob distribuce melanozomů a jejich aktivita v syntéze melaninu. Obsah melaninu je ale rozdílný nejen mezi různými typy kůže, ale také mezi různými místy na těle jedince. Melanocyty s nízkým obsahem melaninu syntetizují enzym tyrozinázu pomaleji a degradují ji rychleji než melanocyty s vysokým obsahem melaninu (Costin et Hearing, 2007). Melanocyty jsou schopny reagovat na množství UV záření dopadajícího na pokožku. Za fyziologických okolností jsou takto stimulovány k syntéze melaninu, který je předáván okolním keratinocytům k ochraně jejich DNA před škodlivým vlivem UV záření. UV záření depolarizuje melanocyty, to vyústí ve zvýšení exprese proteinů potřebných k opravě DNA a zapříčiní lepší přežívání melanocytů, které jsou také následně odolnější vůči proapoptickým signálům (Bellono et Oancea, 2013). Tento mechanismus následně umožní zvýšení odolnosti pokožky vůči škodlivému vlivu UV záření (Lee et al., 2013). Snížení poškození DNA buněk epidermis efektivnější ochranou před UV zářením může být jedním z důvodů pro menší prevalenci kožních nádorů u lidí s tmavou pletí (Yamaguchi et al., 2006). Na druhé straně existují hypotézy, které poukazují na možnost, že určitá rezistence k proapoptickým signálům může usnadnit maligní transformaci a dát vznik melanomu (Bivik et al., 2006). Z těchto poznatků tedy vyplývá, že melanocyty musí být ve své proliferaci a aktivitě pečlivě regulovány a porušení těchto homeostatických mechanismů může hrát jednu ze zásadních rolí v patogenezi maligní transformace. Proto je nezbytné pečlivé pochopení signálních drah účastnících se této regulace za vývoje i v dospělosti, abychom mohli lépe objasnit vznik a vývoj melanomu.

#### 1.1.5. Specifické znaky melanocytů

K identifikaci melanocytů v histologických řezech se používá imunohistochemické značení pomocí monoklonálních protilátek, protože klasická histologická barvení většinou nejsou dostatečná ke spolehlivému odlišení melanocytů od keratinocytů v kontextu epidermis. Mezi základní protilátky, které se rutinně používají, patří anti S-100B protein, což je znak mající vysokou senzitivitu, ale nízkou specifitu, protože jde o obecný znak vyskytující se u buněk pocházejících z neurální lišty. Existují i znaky, které jsou specifičtější právě pro melanocyty. Tím je například HMB-45 - glykoprotein, který je vázán v membráně melanozomů. Dále se k identifikaci melanocytů užívá detekce tyrozinázy, která je zásadním enzymem v dráze syntézy melaninu, jak bylo popsáno výše. Melan-A/MART-1 je také vysoce specifická

protilátka vážící se na proteiny účastníci se syntézy melaninu přítomné v matrix melanozomů (Gown et al., 1986; Carlson et al., 2005).

## 1.2. MELANOM

Ve vyspělých zemích představují nádorová onemocnění v populaci druhou nejčastější příčinu úmrtí po chorobách kardiovaskulárního ústrojí (27tisíc/rok, ÚZIS 2010). S rostoucí životní úrovní a s neustále se zvyšující délkou života se stávají komplexním zdravotnickým, sociálním ale i ekonomickým problémem na celosvětové úrovni i přes neustálé pokroky ve výzkumu protinádorové terapie. Společným znakem nádorových onemocnění je nekontrolovaný růst buněk, který není regulován v rámci integrity organismu (Povýšil et Štajner, 2011).

Maligní kožní nádory lze podle histogeneze dělit do několika skupin. Patří sem samozřejmě nádory epitelové vycházející z epidermis a kožních derivátů (bazocelulární karcinom, dlaždicobuněčný karcinom, mikrocystický adnexální karcinom a sebaceózní karcinom), dále nádory mezenchymové (dermatofibrosarkom, angiofibrosarkom, angiosarkom, Kaposiho sarkom), kožní lymfomy (mycosis fungoides, CD30+ lymfomy, folikulární lymfom) a melanocytární nádory, kam patří melanom (upraveno podle Štork, 2007). Tato diplomová práce se zabývá právě melanomem, nádorem vycházejícím z neoplastické proliferace melanocytů.

Incidence melanomu v České republice se pohybuje okolo 19/100 000 obyvatel za rok a konstantně se zvyšuje – za posledních 20 let se dokonce ztrojnásobila. Mortalita se pohybuje kolem třech případů/100 000 obyvatel za rok (ÚZIS, 2010). Přesto, že jeho podíl v rámci kožních nádorů je pouze v jednotkách procent, je melanom odpovědný až za 75% všech úmrtí v souvislosti s kožními nádory. Velmi alarmující je fakt, že ačkoli medián výskytu melanomu je okolo 60 let, je melanom ve věkové skupině 25-29 let vůbec nejčastějším maligním nádorem (Swetter, 2012). Proto v rámci této problematiky probíhá intenzivní výzkum a hledání nových léčebných schémat.

Navzdory určitým pokrokům ve znalosti patogeneze a zavádění nových léčebných schémat je prognóza metastazujícího melanomu velmi špatná, jednorocní přežití se pohybuje mezi 33-62% v závislosti na typu a lokalizaci metastáz (Davar et al., 2011). O poznání lepší je však přežití pacientů v časném stádiu onemocnění, kde lze prostou, i když radikální chirurgickou excizi považovat za kurabilní. Díky edukaci a zlepšené primární prevenci obyvatelstva spolu se zlepšením diagnostiky v časných stádiích je tedy mortalita, na

rozdíl od incidence, již po několik desetiletí prakticky stabilní (Shenenberger, 2012; Krajsová, 2010).

Vývoj melanomu probíhá nejčastěji ve třech fázích. Nejprve nacházíme léze označené jako *melanoma in situ*, tedy stav kdy nádorové buňky nepřesahují přes bazální membránu. Poté se nádor může šířit radiálně do stran a v poslední fázi nastává nejméně příznivá vertikální progresse nádoru (Elder, 2011).

Povrchově se šířící melanom (SSM) je nejčastější u osob se světlým fototypem, který se nazývá fototyp I. Většinou má iniciální fázi radiálního šíření před tím, než nastává vertikální invazivní růst. Často začíná jako tmavá makula, která vykazuje některé z ABCDE kritérií (viz níže). Druhým nejčastějším typem melanomu je nodulární melanom (NM). Tento typ vynechává radiální růstovou fázi šíření a rychle začíná růst vertikálně a invazivně, není výjimkou, že zakládá časně metastázy. Klinicky je patrný jako tmavě namodralý, hnědý nebo až černý nodulus, který může krvácet, svědit nebo podléhat povrchové ulceraci, většinou zde nelze jednoznačně uplatnit ABCDE kritéria. Další typem je v bělošské populaci relativně vzácnější varianta akrálně lentiginózního melanomu (ALM). Jak jeho název napovídá, vyskytuje se především na koncových částech končetin. Tato varianta je naopak nejčastější u afroamerické rasy, kde často zůstane nepovšimnuta a je diagnostikována zpravidla až v pokročilejším stádiu, s čímž souvisí velmi špatná prognóza. Další popisovanou klinickou variantou melanomu je již vzácnější amelanotický melanom, charakteristický svou barvou. Makroskopicky se jeví jako růžová či šedavá kožní eflorescence a může být zaměněn za jiné kožní nádory jako je bazocelulární a spinocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom (Shenenberger, 2012).

### 1.2.1. Diagnostika melanomu

Melanom můžeme nalézat na nejrůznějších místech, vedle nejčastější kožní lokalizace je znám také primární melanom oka (*uvea, choroidea*) nebo sliznic. Pro klinické posouzení kožních melanocytárních lézí byla navržena takzvaná ABCDE kritéria, kde jsou zhodnoceny nejčastější varovné znaky léze. Posuzuje se asymetrie léze (Asymmetry), nepravidelnost ohraničení pigmentové makuly (Border), barevná pestrost (Colour), kdy jsou v rámci skvrny různé odstíny barev. Zejména znepokojuje je přítomnost více barevných odstínů, od tmavě hnědé až černé po světlé hnědé či růžové okrsky. Přítomnost šedavých až namodralých závojų může být příznakem regresivních změn (Balch et al., 1978; Rigel et al., 2005; Štork,

2007) Dále se posuzuje průměr (Diameter). Pro melanom je charakteristický průměr nad 6 mm, ale zásadním varovným příznakem je jakákoli růstová fáze přesahující 3 mm za rok. Posledním znakem hodnoceným v rámci ABCDE pravidla je vývoj skvrny v čase (Evolution; Rigel et al., 2005).

Zcela zásadní pro diagnostiku melanomu a další klasifikaci je histopatologické vyšetření. Ani toto vyšetření ale nedokáže vždy jednoznačně určit, zda se jedná o lézi benigní či maligní, proto je nutná důsledná klinicko-patologická korelace nálezu. Melanom se vyznačuje nepravidelně umístěnými ložisky melanocytů v celé šíři epidermis, které přestupují přes bazální membránu do hlubších vrstev. U NM může být dokonce epidermis intaktní a centrem melanocytů je až dermis. Nádorově změněné melanocyty mají časté buněčné atypie včetně výrazně hyperchromních jader. Nověji se prognosticky hodnotí i počet přítomných mitóz na  $\text{mm}^2$  (Ross, 2006). V praxi se však nejvíce užívá několika histopatologických kritérií, které rozdělují melanomy do prognostických skupin. Jednou z nich je klasifikace podle Clarka, která hodnotí invazi růstu dle anatomických částí kůže (Balch et al., 1978). Od tohoto hodnocení se v posledních letech spíše již upouští, pro její nižší prognostickou výpovědní hodnotu. V klinické praxi se nejvíce uplatnila klasifikace podle Breslowa, která také hodnotí vertikální růst nádoru. V tomto případě se histologicky v milimetrech měří hloubka invaze nádoru od *stratum granulosum* epidermis až po nejhluběji zasahující nádorové buňky. Vedle poměrně snadného provedení má tato klasifikace vysokou prognostickou výpovědní hodnotu v pětiletém sledování přežívání pacientů. Čím vyšší je hodnota Breslowa, tím je vyšší potenciál k časnému metastazování a také významně horší prognóza (Balch et al., 1978). Dalším velmi důležitým prognostickým faktorem je přítomnost ulcerace, která může být spojena s novotvorbou granulační tkáně (Ross, 2006).

U melanomu lze pomocí histologického vyšetření pozorovat řadu morfologických variant. Melanomy mohou připomínat nádory původu epitelového, mezenchymového a dokonce i hematologické malignity (Trefzer et al., 1999; Kodet et al., 2013). V diferenciálně diagnostických úvahách se lze také opřít o imunohistochemické vyšetření. Nejčastěji používané jsou protilátky proti S-100B, HMB-45 a Melan-A/MART-1 (Carlson, 2005), jak již bylo uvedeno výše. Tyto markery se také mohou použít při snaze o zařazení metastázy s neznámým zdrojem k primárnímu nádoru – je tak možné rozlišit metastázu melanomu od jiných epitelových či mezenchymálních nádorů. Stejným způsobem je možné využít je

k hledání okultních metastáz, kde klasické histologické metody vykazují příliš nízkou senzitivitu (Cochran, 2000). Navzdory nezanedbatelnému přínosu imunohistochemického značení stále neexistuje 100% specifický a 100% senzitivní marker, který by byl dostatečný pro jednoznačnou diagnostiku a napomohl i odlišit benigní a maligní nádorové melanocyty. V běžné praxi je pro velkou fenotypovou variabilitu melanomů nutné použít více znaků k odlišení diagnosticky nejednoznačných lézí a nádorových subtypů (Carlson, 2005).

### 1.2.2. Genetika melanomu

Vznik melanomu je komplexní proces, jenž je doprovázen genetickými a epigenetickými změnami, které se mohou dědit, nebo vznikat *de novo*. Rodinná predispozice je považována za nezanedbatelný rizikový faktor, mezi nejznámější patří mutace genu pro CDKN2A v zárodečné linii. Tento gen kóduje dva tumor supresorové proteiny – p16 a p14, které negativně regulují signální dráhu Rb a p53 (Chin, 2003).

Cílené studie detekovaly tři klíčové signální dráhy, které jsou v melanomech vysoce deregulovány. Jsou jimi MAPK (mitogenem aktivovaná kinázová) dráha jako důsledek mutace v RAS, RAF a KIT, PI3K/AKT (fosfoinosid-3 kinázová) dráha v důsledku mutace v RAS, PTEN a AKT a také p16INK4 dráha vzhledem k mutacím v CDKN2A, ARF a p53. Porušení jemné rovnováhy, která ve zpětnovazebných signálních okruzích panuje, může být zásadní pro deregulaci buněčného cyklu a vznik nádorového bujení. Detailní analýzy těchto signálních drah daly podnět k vývoji nových strategií pro individuální cílenou terapii, viz níže (Wangari-Tabot et Chen, 2013).

Nejčastěji zmiňovanou poruchou je mutace v BRAF, což je serin/treonin kináza fosforylující MEK v MAP kinázové dráze. Je odpovědná za buněčnou proliferaci a její mutaci můžeme nalézt přibližně u poloviny melanomů (Chin, 2003). Jasně je také, že tyto mutace samotné nejsou dostatečné pro maligní transformaci melanocytů, většina melanocytárních lézí (70-82%) totiž BRAF mutaci také obsahuje, nicméně jen malá část z nich poté progreduje do stádia melanomu a u zbylé části se proliferativní aktivita zastavuje. Mutace v těchto genech jsou tedy časně, ale nejsou dostačující pro iniciaci růstu melanomu a jeho progresi. Větší počet získaných melanocytárních névů je rizikovým faktorem pro vznik melanomu, ale jejich role v tumorigenezi není zcela objasněna, ať už pro heterogenitu névů či různost genetických alterací (Kumar et al., 2004).

Faktem také je, že signální dráhy, které jsou aktivní při vývoji melanocytů v embryonálním období, se mohou postnatálně patologicky aktivovat a podílet se na vzniku melanomu. Takovou signální dráhou je např. Wnt/ $\beta$ -catenin. Tato dráha je nezbytná a zároveň dostatečná pro určení osudu buněk pocházejících z neurální lišty a jejich nasměrování směrem k melanoblastům skrze regulaci aktivity  $\beta$ -catenin (Cooper et Raible, 2009). Podílí se také na indukci EMT v různém stádiu vývoje. Wnt/ $\beta$ -catenin může aktivovat EMT i v postnatálním životě, což za určitých podmínek může být podnětem např. k progresi nádorového bujení (Larue et Bellacosa, 2005).

### 1.2.3. Léčba melanomu a nové trendy

Základní léčba primárního melanomu, i přes zavedená nová léčebná schémata, je i nadále chirurgická. Hloubka invaze stanovena podle Breslowa určuje definitivní velikost okrajů excize (viz Tab. 1) pro jednotlivá stadia byly učeny šíře okrajů na základě rozsáhlých studií sledujících asociaci mezi šířkou okrajů a průměrným přežitím pacientů (Sober et al., 2001). Doporučená šířka také závisí na typu melanomu. Smyslem radikální chirurgické excize nádoru do zdravé tkáně je odstranit reziduální melanomové buňky, které se již mohly rozšířit do okolní tkáně, a tudíž zajistit spolehlivé odstranění nádoru a minimalizovat tak lokální recidivu onemocnění (Shenenberger, 2012).

Tab. 1 (upraveno podle Sober et al., 2001; Shenenberger, 2012): Klasifikace podle Breslowa, pětileté přežití a doporučená šířka chirurgického lemu.

Hloubka invaze (Breslow)	pětileté přežití	šířka chirurgického lemu
≤1,0 mm	92–97%	0,5 cm
1,01–2,0 mm	80–96%	1,5 cm
2,01–4,0 mm	60–75%	2 cm
≥4,01 mm	50%	2 cm

Do standardizované chirurgické léčby spadá také odstranění a vyšetření sentinelové uzliny (SLN). SLN jsou první spádové uzliny odpovědné za lymfatickou drenáž okrsku tkáně postižené nádorem. Tento přístup vychází z řady retrospektivních studií a nahrazuje tak dříve běžně používanou radikální exenteraci potenciálně postižené oblasti. V případě melanomu se SLN standardně vyšetřuje při hodnotě Breslowa nad 2 mm (klinické stádium IIa; Crowson et al., 2006). Je nutno poznamenat, že melanom je nádor, jenž může metastazovat i za velmi dlouhou dobu po excizi primárního tumoru. Je možné, že zde hraje roli i rozdílné působení

nádorového mikroprostředí (viz dále; Uhr et Pantel, 2011; Kodet et al., 2013). Pokud je při vyšetření SLN nalezena metastáza, a to i v podobě mikrometastáz, je následně provedena radikální exanterace postižené oblasti (Crowson et al., 2006). Chirurgicky lze také řešit i solitární metastázy vzniklé na podkladě hematogenního rozsevu, nicméně je vždy nutné zhodnotit benefit případné, mnohdy náročné, operace pro pacienta. V době hematogenního metastazování mohou být již na různých místech založeny také mikrometastázy, které nelze detekovat pomocí zobrazovacích metod a chirurgický zákrok tak již není opodstatněn (Sober et al., 2001).

Po chirurgické terapii u pacientů s vysokým rizikem dalšího vývoje melanomu je používána neoadjuvantní imunoterapie pomocí interferonu alfa. Ta má snahu navodit imunitní odpověď organismu k eliminaci cirkulujících nádorových buněk, případně mikrometastáz a zabránit tak další progresi onemocnění. Na molekulární úrovni má tento cytokin antiangiogenní, imunoregulační, antiproliferativní i proapoptotické účinky. Výsledky randomizovaných studií ovšem nejsou jednoznačné a neexistují tedy ustálené normy pro množství a délku, ve kterém se má interferon podávat pacientům. Liší se také názor na to, kteří pacienti budou z této imunoterapie nejvíce profitovat (Tarhini et al., 2012), standardně se používá pro pacienty s pozitivní sentinelovou uzlinou (Davar et al., 2011). Nejčastější modalita standardně používané u mnoha jiných nádorů – radioterapie a chemoterapie – nemají v léčebných schématech pro melanom významnou pozici, používají se především v paliativní léčbě metastazujícího melanomu (Davar et al., 2011).

Léčba metastazujícího melanomu prošla v posledních letech dynamickou změnou umožňující alespoň částečně zlepšit přežívání pacientů. V popředí se nachází biologická tzv. cílená onkologická léčba. Velmi zásadní je, že tato vysoce specifická léčba nemusí být zaměřena přímo na nádorové buňky a jejich molekulární komponenty, ale také na nádorové stroma, tedy buňky a molekuly, které jsou schopny určitým způsobem modulovat růst a vývoj nádoru (viz dále). Porozumění komunikace mezi nádorovými buňkami a stromatem nádoru je jednou z možných cest v budoucí komplexní nádorové léčbě, a to nejen u melanomu (Carlson et al., 2005; Matta et Ralhan, 2009). K správnému zaměření léčby je samozřejmě potřeba detailně prostudovat a popsat interakce, které mezi buňkami fungují, a zaměřit se také na možné individuální rozdíly mezi konkrétními nádory.

Jako příklad cílené terapie zaměřené přímo na nádorové melanocyty mohou sloužit inhibitory MAP kináz, které jsou schopny potlačovat nádorový růst a rezistenci nádorových melanocytů k apoptóze. Konkrétním příkladem je BRAF inhibitor *vemurafenib*. Je používán v terapii metastazujícího melanomu a inhibuje klíčovou složku MAPK kaskády, která je patologicky aktivována. Jak již ale bylo zmíněno výše, tato mutace není přítomna u všech melanomů, proto je potřeba striktně individualizovaného přístupu, jelikož tento inhibitor by pacientům bez přítomnosti BRAF mutace nepomohl (Wangari-Talbot et Chen, 2013).

Příkladem léčebného přípravku cíleného na komponenty nádorového stromatu je *bevacizumab*, což je poměrně rozšířená protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF). Tato protilátka byla zavedena pro použití u jiných nádorů (např. spinocelulární karcinomy hlavy a krku; Matta et Ralhan, 2009), ale existují studie oceňující potenciál této monoklonální protilátky i u melanomu (Carlson et al., 2005). Působí antiangiogenně a snižuje tedy prokrvení nádoru a jeho výživu. Kombinací více přístupů je *sorafenib*, inhibitor více MAP kinázových drah nádorových buněk a zároveň také receptoru pro VEGF a destičkového růstového faktoru (PDGF; Wangari-Talbot et Chen, 2013).

### 1.3. NÁDOROVÉ STROMA

Nádorové bujení a jeho progresi nelze vnímat jako nezávislou událost, která se vztahuje pouze ke genetickým mutacím a nekontrolovanému růstu nádorových buněk. Okolní buňky, tedy primárně nenádorové populace, ovlivňují nádorové buňky pomocí mezibuněčných interakcí, kterých se účastní řady růstových faktorů a cytokinů (Xing, 2010). V předchozí kapitole bylo zmíněno, že nádor jako takový se neskládá pouze z nádorových buněk. Pro vývoj, přežití a další proliferaci nádoru jsou velmi zásadní epitelově mezenchymové interakce. Již v roce 1889 byla formulována hypotéza, která říká, že stejně jako semeno potřebuje pro svůj růst úrodnou půdu, tak i nádorové buňky potřebují okolo sebe vhodné mikroprostředí (podrobněji popsáno ve Fidler, 2003).

#### 1.3.1. Složení a vznik nádorového stromatu

Toto mikroprostředí je tvořeno přímo buňkami, složkami ECM, ale i růstovými faktory, cytokiny, chemokiny a jinými molekulami modulujícími dané prostředí. Z buněk, které jsou v těsném kontaktu s nádorovými buňkami, lze jmenovat např. stromální fibroblasty (CAFs) a jejich specializovanou variantu myofibroblasty, endotelové buňky a buňky imunitního



systému. Žádné z těchto buněk nemají maligní potenciál, ale vlivem interakcí mezi sebou a především s nádorovými buňkami získávají abnormální fenotyp aktivovaných buněk a mění se tak jejich funkce. Vznik komponent nádorového stromatu nelze oddělit od progresu vlastního nádorového parenchymu, obě složky se navzájem výrazně ovlivňují a vývoj tedy probíhá paralelně u obou složek nádoru. Pro lepší pochopení interakcí v nádoru je tedy zcela zásadní vnímat nádorové mikroprostředí jako komplexní celek (Li et al., 2007). Role buněk imunitního systému je poměrně rozmanitá. V klinickém kontextu je chronický zánět a nádorové bujení poměrně těsně spjato a s trochou nadsázky lze nádorové bujení označit jako ránu, která se nikdy nezhojí (Kolář et al., 2012). Prozánětlivé cytokiny jsou sekretovány nádorovými buňkami ale i CAFs a chemotakticky přitahují buňky imunitního systému do prostoru nádoru (Xing, 2010). Jedním z buněčných typů jsou monocyty, které jsou do oblasti deregulované proliferace nádorových buněk atrahovány chemotaktickými látkami. Po kontaktu s buňkami nádoru se mohou diferencovat v stromální makrofágy. M2 typ makrofágů, který je pro výskyt v nádoru typický, zde produkuje řadu cytokinů a chemokinů a působí tak imunosupresivně, což nahrává progresi nádoru (Talmage et al., 2007). Makrofágy nejčastěji vstupují do částí nádoru, které podléhají nekróze kvůli hypoxickým podmínkám, a stimulují angiogenezi produkcí faktorů jakými jsou VEGF, hepatocytový růstový faktor (HGF), metaloproteáza 2 (MMP2) nebo např. interleukin 8 (IL-8). Podobné faktory secernují také neutrofily v nádoru a také tedy působí angiogenně (Li et al., 2007). U dalších typů imunitních buněk není pro maligní melanom dokumentována významnější funkce.

Cévní zásobení a konkrétně novotvorba cév je samozřejmě důležitá pro přežití nádorových buněk. Krom příjmu živin a odnětí metabolitů, bez kterých by nádor nemohl růst a vyvíjet se, přivádí biologicky aktivní látky a endotel sám může do nádorového stromatu takové látky i produkovat (Nagy et al., 2009). Podobné faktory produkují také neutrofily (Talmadge et al., 2007). Už po dlouhá desetiletí je známo, že nádorové cévní zásobení je vysoce abnormální. Cévy vykazují abnormální tvar i rozložení, jsou více větvené s častými arteriovenózními zkraty, normální hierarchie zahrnující kapiláry je spíše výjimkou. Tyto novotvořené cévy nemají ani standartní stavbu své stěny, která je často fenestrována a cévy jsou v důsledku toho hyperpermeabilní. Díky tomu je sice lépe umožněn prostup imunitních buněk do oblasti nádoru, ale zároveň může docházet k mikrometastazování nádorových buněk, které se takto snáz dostanou do oběhu. Hyperpermeabilita cév navíc způsobuje

nerovnováhu mezi osmotickým a onkotickým tlakem krve, což vede ke zvýšení intersticiálního tlaku a dále k hypoxii (Nagy et al., 2009). Tímto mechanismem je indukována zvýšená sekrece VEGF, a to nejen nádorovými buňkami, ale i CAFs a dalšími buňkami stromatu, kterou následuje takzvaný angiogenní *switch*, jenž je zodpovědný za následnou novotvorbu cév (Li et al., 2007). Jak již bylo zmíněno výše, blokování VEGF nebo jeho receptoru může být cílem biologické léčby nádorů.

Buněčné populace nejsou jediné, které se podílí na regulaci nádorového mikroprostředí a progresi nádoru. Významnou roli zde sehrává i složení ECM, která je dynamicky remodelována a ovlivňována složkami nádorového mikroprostředí. Zároveň tvoří síť, ke které se všechny komponenty nádoru, tedy stromální i nádorové buňky, mohou upínat. Hojně jsou zde přítomny rozpustné vysoce adhezivní molekuly (například fibronectin a tenascin; Van Obberghen-Schilling et al., 2011), dále proteoglykany a kolageny. Nádorová progresie je mnohostupňový proces, v určité fázi je ale typická ztráta adheze nádorových buněk zprostředkovaná především změnou ECM. Samotná ECM nemá tedy pouze charakter kostry, ale významně se může podílet na dynamických signalizačních změnách v rámci tumorigeneze. Transformované buňky pak mohou získat invazivní charakter, mění se exprese integrinů na jejich povrchu a následná interakce s růstovými faktory vede k progresi růstu nádoru, metastazování a také angiogenezi (Jinka et al., 2012).

Integriny jsou evolučně konzervované receptory buněčné adheze hrající důležitou roli ve vývojové biologii a patologických procesech jako jsou nádorová onemocnění. Skupina integrinů zprostředkovává adhezi buněk nádorového stromatu i parenchymu k ECM a účastní se také specializovaných mezibuněčných interakcí (Barczyk et al., 2010). Integriny dále zprostředkovávají vazbu epidermálních kmenových buněk na kolagen typu IV v bazální membráně a také na laminin a fibronectin (Chen et al., 2013). Bylo popsáno, že integriny typu  $\beta 1$  zprostředkovávají vazbu mezi kolagenem typu IV a nádorovými buňkami. Tato vazba inhibuje apoptózu buněk a navíc umožní jejich další proliferaci a migraci (Ohlund et al., 2013). Integriny jsou také schopné tvořit vazbu s dalšími adhezivními molekulami na buněčném povrchu, např. CD54 nebo CD106, vyskytujících se v kmenovém prostředí (Barczyk et al., 2010).

### 1.3.2. Stromální fibroblasty

CAFs jsou nejhojněji používanou komponentou v *in vitro* modelech simulujících nádorové mikroprostředí, pravděpodobně proto, že jejich izolace nepředstavuje nijak závažný problém. Z tohoto důvodu jsou také všeobecně považovány za stěžejní komponentu stromatu v nádoru. V normální pojivové tkáni je jejich hlavní funkcí produkce komponent ECM a podílí se i na tvorbě bazálních membrán, například různých typů kolagenu, lamininu a fibronektinu (Li et al., 2007; Van Obberghen-Schilling et al., 2011). Pojivová tkáň s nebuněčnými složkami je stále dynamicky remodelována. Tento proces je regulován souborem proteolytických enzymů, především metaloproteáz, které jsou nezbytné pro správnou funkci celého systému, naproti tomu jejich deregulace může naopak znamenat zásadní krok k patologickým pochodům typu nádorového bujení (Pytliak et al., 2012).

CAFs jsou buňky vřetenitého tvaru s velkým migračním potenciálem, na rozdíl od buněk epitelových exprimují vimentin, typický znak mezenchymálních buněk, a lze je tak snadno imunohistochemicky detekovat. Dalším imunohistochemickým znakem může být exprese alfa svalového aktinu ( $\alpha$ -SMA), která je přítomna zejména u myofibroblastů a umožňuje jim tvorbu stresových kontraktilních vláken. Myofibroblasty jsou považovány za vysoce aktivovanou formu fibroblastů a můžeme je přirovnávat k aktivovaným fibroblastům objevujícím se v hojící se ráně, kde jsou odpovědné za kontraktilní vlastnosti jizvy a její remodelaci. Myofibroblasty v hojící se ráně po ukončení fáze hojení podléhají apoptóze nebo se vrací do původního méně aktivního stavu a  $\alpha$ -SMA již neexprimují, zatímco v nádorovém stromatu jsou aktivovány trvale (Franco et al., 2010). Limitujícím faktorem je omezené množství specifických znaků, které by jasně dokázaly odlišit populaci normálních fibroblastů od CAFs a mnohdy nelze přesně stanovit hranice nádorového stromatu a normální tkáně. Některé *in vitro* studie navíc dokumentují, že fibroblasty odebrané ze zdravé tkáně pacientů trpících nádorovým onemocněním vykazují aktivovanější fenotyp než fibroblasty od kontrolní skupiny bez patologického nálezu (Schor et al., 1986). Přes výše popsané skutečnosti jsou krom exprese vimentinu a  $\alpha$ -SMA dokumentovány u CAFs i exprese dalších poměrně charakteristických markerů. Příkladem mohou být fibroblastový specifický protein, receptor  $\beta$  pro PDGF, fibroblasty aktivující protein, S100A4 protein a desmin, ale i tak jsme v tomto směru poměrně limitováni (Xing, 2010). Určitou možností je charakterizovat chování fibroblastů *in vitro*, které je rozdílné u dermálních fibroblastů a CAFs.

#### 1.3.2.1. *Původ stromálních fibroblastů*

Ani původ CAFs není stále zcela jednoznačně zodpovězen a stojí v centru mnoha vědeckých diskuzí a hypotéz. Pro jejich původ bylo vytvořeno více teorií podložených určitými pozorováními, přičemž je zásadní zmínit, že tyto teorie se navzájem nevylučují. V současnosti se dokonce ukazuje, že různé mechanismy podílející se na vzniku CAFs mohou existovat nejen v rozdílných nádorech, ale i paralelně v rámci jednoho nádoru (Haviv et al., 2009). Teorie zahrnují aktivaci fibroblastů z lokálního mezenchymu, přeměnu místních nádorových buněk EMT a migraci a aktivaci buněk odvozených z kostní dřeně.

Lokální mezenchym obklopuje maligně transformované buňky již v raném stádiu vývoje. Není ovšem jasné, jaké signály jsou zodpovědné za jejich aktivaci a změnu v signalizačních kaskádách těchto buněk. Předpokladem je, že nádorový parenchym produkuje faktory, které spolu s přímými buněčnými interakcemi mezi nádorovými buňkami a okolními fibroblasty dokáže indukovat fenotypové a funkční změny v buňkách lokálního mezenchymu (Haviv et al., 2009). Experimenty ověřily například vliv nádorového růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), který může mít podíl na transformaci fibroblastů v okolí nádoru v myofibroblasty, což je ověřeno iniciací exprese  $\alpha$ -SMA. Není zcela jasné, zda tyto buňky získají fenotyp aktivovaných myofibroblastů trvale a zda oplývají i dalšími příslušnými charakteristikami CAFs (Casey et al., 2008). Dalším faktorem je skupina molekul jménem galektiny ovlivňující běžné děje ve tkáni – adhezi buněk, přenos signálu i apoptózu, ale jsou zapojeny i v patologických dějích, především nádorovém bujení (Fred Brewer, 2002). Galektin-1 je součástí ECM a podílí se na aktivaci fibroblastů v myofibroblasty ve stromatu nádoru i hojící se ráně, a to nezávisle na působení TGF- $\beta$  (Dvořánková et al., 2011). V nádorovém stromatu spinocelulárních karcinomů hlavy a krku byl galektin-1 v ECM dán do příčinné souvislosti s expresí  $\alpha$ -SMA. Přítomnost obou těchto molekul v jedné lokalizaci je navíc považována za prognosticky negativní znak (Valach et al., 2012).

Další teorie platná především pro epitelové nádory staví do centra pozornosti nádorové buňky, jejichž část může dát pomocí EMT vznik CAFs. EMT se podílí na hojení ran, embryogenezi i metastazování (Li et al., 2007). Fakt, že nádorově transformované buňky se rozvolňují z uspořádání příslušícímu epitelům a získávají invazivní charakteristiky a migrační potenciál je podkladem této myšlenky (Plzák, 2010). Tento původ CAFs je zpochybňován faktem, že zásadní genetické mutace vyskytující se v nádorově transformovaných buňkách by

musely být přítomny i v CAFs, ale tuto shodu v buňkách nacházíme jen zřídka. Možným vysvětlením ovšem je, že EMT může být vedlejším zdrojem CAFs vedle jiného hlavního mechanismu jejich vzniku (Li et al., 2007). Tuto možnost podporují *in vitro* modely, které ukázaly, že CAFs jsou schopny v normálních keratinocytech navodit EMT (Lacina et al., 2007). Podobným způsobem, endotelově mezenchymovým přechodem, mohou vznikat CAFs i z endotelu (Xing, 2010).

Studie zabývající se původem CAFs potvrdily vysokou plasticitu buněk odvozených z kostní dřeně, takzvaných cirkulujících mezenchymových kmenových buněk (hMSC). Tyto buňky jsou *in vitro* schopny diferenciaci do různých buněčných linií, především myogenní, osteogenní, adipogenní a chondrogenní (Fang et al., 2005). Experimentálně bylo ověřeno, že kondicionované médium z nádorových buněk, konkrétně z karcinomu prsu, má při kultivaci hMSC velký vliv na jejich fenotyp. Buňky byly schopny za 30 dní pod vlivem tohoto média aktivovat expresi  $\alpha$ -SMA, PDGF a vimentinu a diferencovat se tedy v myofibroblasty. Tyto buňky navíc následně *in vitro* stimulovaly růst nádorových buněk a jejich expresní profil se velmi podobal myofibroblastům (Mishra et al., 2008).

#### 1.3.2.2. Význam a funkce stromálních fibroblastů

Komplexní nádorové mikroprostředí hraje zásadní roli v biologii a chování nádorů, což je již dobře zdokumentováno např. u epitelových nádorů hlavy a krku (Lacina et al., 2007, Strnad et al., 2009, Kolář et al., 2012). V dřívějších dobách byly v centru pozornosti především nádorově transformované buňky, v současnosti se ale pozornost přesouvá i ke studiu CAFs a epitelově mezenchymovým interakcím v nádorech. Tyto interakce jsou samozřejmě obousměrné a hrají ve vývoji, přežití a další proliferaci nádoru velmi zásadní roli. Iniciální změny v okolním stromatu jsou vnímány jako snaha o „napravení škody“ (Franco et al., 2010). Úloha CAFs a jejich interakce v rámci nádorového mikroprostředí mají různé aspekty.

Prvním aspektem je podpora růstu primárního nádoru. Ta je zajištěna produkcí četných růstových faktorů, cytokinů a proteáz. Patří mezi ně klasické mitogeny pro epitelové buňky jako je HGF, epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), inzulinu podobný růstový faktor (IGF-1) nebo TGF- $\beta$  (Xing, 2010; Cirri et Chiarugi, 2011). Funkce TGF- $\beta$  v normálním epitelu je inhibovat růst buněk a jejich proliferaci. Nádorové buňky ovšem na tento podnět nereagují, či dokonce reagují stimulací růstu díky modifikaci signálních drah (Casey et al., 2008). Nádorové buňky pak díky dalším mutacím získají také schopnost exprese

TGF- $\beta$  a autokrinně si tedy zajišťují podporu růstu a imunosupresi ve svém okolí (Pardali et Moustakas, 2007). TGF- $\beta$  navíc dále stimuluje CAFs k proliferaci a produkci komponent ECM a také zvyšuje pravděpodobnost jejich přeměny v myofibroblasty, což bylo při použití normálních fibroblastů pozorováno minimálně (Casey et al., 2008).

Mezi produkované cytokiny a chemokiny můžeme řadit stromálními buňkami produkováný faktor 1 (SDF-1/CXCL12) a IL-6, které jsou produkovány CAFs v mnoha různých typech nádorů (Cirri et Chiarugi, 2011). SDF-1 ovlivňuje nitrobuněčné kaskády prostřednictvím receptoru chemokin motiv C-X-C receptor 4 (CXCR4), který je exprimován na nádorových buňkách. CXCL12 produkováný stromatem, především CAFs, dokáže v maligně transformovaných buňkách s CXCR4 na svém povrchu parakrinně stimulovat dráhy vedoucí k zvýšenému přežívání a proliferaci. Přítomnost CXCR4 na membráně metastazujících nádorových buněk zásadně napomáhá k jejich uchycení v orgánech s produkcí CXCL12; v důsledku toho je například v kostní dřeni umožněn vstup metastazujících buněk do mikroprostředí označovaného „*niché*“. Toto biologické působení CXCR4 je fyziologicky zapojeno v regulaci navádění leukocytů do příslušných tkání, ale je dokumentováno, že obdobné mechanismy jsou přítomny i u metastazování maligních buněk z epitelů. Receptor tedy hraje kritickou roli v determinaci míst, kam bude daný nádor metastazovat. CXCR12 je navíc schopen iniciovat angiogenezi v nádoru atrahováním endotelových buněk do nádorového mikroprostředí (Burger et Kipps, 2006). Podpora proliferace byla také dokumentována u molekul IL-8 a CXCL-1 sekretovaných CAFs, které mají taktéž na nádorový klon popsany vliv (Szabó et al., 2013).

CAFs jsou ale nejen schopny ovlivňovat počáteční růst, ale bylo dokumentováno, že dokáží také zvýšit invazivitu nádorových buněk pomocí přímých interakcí mezi buňkami a také parakrinní produkcí proinvazivních molekul (Xing et al., 2010). Jednou z těchto molekul je již výše zmíněná multifunkční molekula TGF- $\beta$  produkováná CAFs, která podporuje EMT nádorově transformovaných buněk a v důsledku tedy i jejich invazivitu. K tomu, aby byla překonána bariéra zabraňující procesu metastazování, musí se nádorové buňky stát pohyblivější a zajistit degradaci a remodelaci extracelulárních komponent (Pardali et Moustakas, 2007). Jedny z nejvýznamnějších proteinů podílejících se na degradaci ECM jsou matrix metaloproteázy (MMPs). MMPs krom své degradační schopnosti také podporují EMT nádorově transformovaných buněk (Pytliak et al., 2012).

Na druhou stranu proliferace CAFs je zprostředkována lokálními růstovými faktory, které mohou být naopak produkovány nádorovými buňkami, a signální výměna mezi oběma buněčnými typy může vyústit v modifikaci ECM a bazální membrány (Karagiannis et al., 2012). Průnik buněk skrze bazální membránu mění klasifikaci nádoru *in situ* na invazivní formu, která nabývá potenciál nejen k lokálnímu ale i metastatickému šíření.

Tab. 2: Příklady molekul ovlivňujících biologické chování nádoru produkovaných CAFs. Upraveno podle Plzák et al., 2010.

Molekula	Zkratka
A disintegrin a metaloproteáza	ADAM
Amfiregulin	
Kostní morfogenetický faktor 4	BMP-4
Produkty cyklooxygenázy	
Fibroblastový růstový faktor 7 a 10	FGF-7, FGF-10
Gremlin 1	
Makrofágy stimulující faktor	GM-SCF
Inzulínu podobný růstový faktor 1 a 2	IGF-1, IGF-2
Interleukin 6 a 8	IL-6, IL-8
Monocyty chemoattrahující protein	MCP-1
Metaloproteázy 1, 2 a 9	MMP-1, MMP-2, MMP-9
Protein S100 A4	
Faktor odvozený ze stromálních buněk 1	SDF-1
Syndekan 1	
Tenascin-C a W	
Transformující růstový faktor $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1
Vaskulární endoteliální růstový faktor	VEGF

Dalším aspektem funkce CAFs je jejich významný podíl na vzniku a udržování takzvaného nádorového „*niche*“. „*Niche*“ představuje prostředí, které má za úkol udržovat a podporovat dediferencované nádorové kmenové buňky (CSCs) a podobá se analogicky normálnímu fyziologickému prostředí, kde jsou udržovány tkáňové kmenové buňky (Motlík et al., 2007). Tyto buňky mají schopnost diferenciaci do různých linií přítomných v nádorovém parenchymu a jejich vlastností je také schopnost sebeobnovy. Tomu odpovídají i výsledky transplantačních studií, kde pouze minoritní populace buněk z nádoru umožnila přenos a uchycení nádoru (Clarke et al., 2006). CSCs exprimují znaky, které jsou považovány za typické pro kmenové buňky, například Sox2, Oct4 a Nanog. Experimentálně byl dokázán

vliv CAFs pocházejících z bazocelulárního karcinomu na embryonální myší fibroblasty. V *in vitro* modelu v nich CAFs indukují expresi znaků multipotentních kmenových buněk, tedy právě Oct4 a Nanog. Takto dediferencované fibroblasty měly pak schopnost následné diferenciace do chondrogenní, osteogenní a adipogenní linie (Szabó et al., 2011). Konvenční protinádorová terapie (především chemoterapie) zaměřené pouze na buňky s vysokou proliferační aktivitou mají proti CSCs malou účinnost, což může být jednou z příčin následného relapsu onemocnění (Clarke et al., 2006).

#### 1.4. FENOTYP NÁDOROVÝCH MELANOCYTŮ A JEJICH BUNĚČNÉ INTERAKCE

Plasticita melanocytů z maligního melanomu je popsána v mnoha experimentech. Fenotyp buněk primárního melanomu a izolovaných buněčných linií se může lišit a charakteristická je obecně i fenotypová variabilita melanomových buněčných linií a závislost fenotypu na kultivačních podmínkách (Kodet et al., 2013).

Nádorové melanocyty při samostatné kultivaci ztrácejí v adhezivním i neadhezivním prostředí typické diagnostické markery (HMB-45, Melan A, Tyr). Jediný znak, který obecně přetrvává, je S100 protein (Kodet et al., 2013). Tyto znaky se ale mohou *in vitro* opět objevit působením kuřecího embryonálního extraktu (CEE) po dostatečně dlouhou dobu. Znovuobjevení diagnostických markerů je schopno vyvolat také médium kondicionované lidskými embryonálními kmenovými buňkami (hESC). Obdobným způsobem působí na nádorové melanocyty kokultivace s CAFs z melanomu (Kodet et al., 2013). Role nádorového stromatu je tedy skutečně unikátní, což dokládá uniformní působení různých stromálních fibroblastů na melanocyty a negativní kontrola v podobě působení HF (Dvořánková et al., 2012).

Při kokultivaci nádorových melanocytů s CAFs z melanomu tedy probíhají změny posouvající fenotyp nádorových buněk blíže k situaci *in vivo* ve tkáni. Takovou změnou je znovuobjevení HMB-45 v normálních melanocytech *in vitro* (Kim et al., 2011; Kodet et al., 2013). Tyto vlastnosti maligního melanomu by měly být zohledněny v diagnostice, jelikož detekce melanomových buněk pomocí standardních markerů může být díky plasticitě melanocytárního fenotypu vysoce zkreslena a vést k falešné negativitě. Pokud bychom chtěli v cirkulaci pacienta detekovat nádorové melanocyty, diagnostické markery mohou být negativní, protože buňky je v tomto prostředí mají schopnost ztrácet, zvláště pokud mají vysoce agresivní potenciál (Clawson et al., 2012).



Nestandardní chování melanomů je s velkou pravděpodobností vysvětlitelné jejich heterogenitou a buněčnou plasticitou. Melanom se skládá z mnoha subpopulací nádorových buněk, přičemž pouze některé z nich mohou získat atributy kmenových buněk. Pro identifikaci těchto buněk v melanomu byl použit model využívající vzniku sfér v neadhezivním prostředí. Tento model má potenciál predikovat funkční fenotyp asociovaný s agresivními melanomy. V kultivačním médiu pro buňky odvozené z neurální lišty vykazovaly tyto buňky vyšší schopnost diferenciaci a zvýšenou expresi znaků kmenovosti Sox2, Nanog, Klf4, Oct4. Ve srovnání s působením adhezivního prostředí však nebyla prokázána vyšší sebeobnova ani tumorigenicita (Ramgolam et al., 2011). Sféry ovšem vykazovaly vyšší migrační a invazivní kapacitu. Navíc buňky ze sfér efektivněji inhibovaly aktivaci a proliferaci T-buněk. Melanomové sféry tedy mohou mít imunomodulační funkci a tudíž specifickou roli v invazivitě a potlačení protinádorové imunity. Zdá se, že agresivní fenotyp buněk a heterogenita v rámci nádoru může být zajištěna i jinými subpopulacemi než nádorovými kmenovými buňkami (Ramgolam et al., 2011).

Sféry melanocytů injikované do myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID) způsobily v počtu méně než sto injikovaných buněk růst tumorů. Nádorové melanocyty pěstované v telecím séru byly také tumorigenní, ale s menší efektivitou. Buňky tvořící tumory v myších vykazovaly typické znaky diferencovaných melanocytů. Buňky ve sférách byly heterogenní v expresi dediferenciačních markerů a v porovnání s buňkami v adhezivním prostředí vykazovaly zvýšenou expresi Nanog a Oct4. Tato data podporují názory o heterogenní povaze maligních melanomů. Na jejich základě můžeme tvrdit, že sféry a jim odpovídající nádory narostlé v imunokompromitovaných myších reprezentují kvalitní model pro výzkum mezibuněčných interakcí v maligním melanomu (Perego et al., 2010).

Ovlivnění fenotypu a chování nádorových melanocytů embryonálním prostředím bylo dále potvrzeno xenotransplantačními pokusy. Po vpravení dediferencovaných nádorových melanocytů s plastickým fenotypem do neurální lišty kuřecího embrya byl sledován osud nádorových buněk. Takto transplantované buňky překvapivě netvořily nádory, ale putovaly z neurální lišty do příslušných tkání embrya tak, že respektovaly naprogramované migrační dráhy buněk neurální lišty. Lidské nádorové melanocyty jsou tedy schopny reagovat na kuřecí embryonální mikroprostředí a jsou schopny reprogramovat svůj metastatický fenotyp (Kulesa et al., 2006).

V *in vitro* modelech simulujících nádorové mikroprostředí se standardně používá vliv CAFs. Nejinak je tomu i u melanomu, jak již bylo mnohokrát zmíněno výše. Nicméně v nádorech vycházejících z minoritních buněčných populací epitelů je situace ještě komplexnější. Na transformované melanocyty mají kromě fibroblastů vliv také okolní keratinocyty zdravé tkáně. Vliv keratinocytů dokládá i to, že melanom je na jejich působení závislý ve fázi radiálního růstu (viz výše), kdežto ve vertikální fázi jsou transformované buňky poměrně nezávislé (Van Kilsdonk et al., 2010).

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium interakcí mezi nádorovými buňkami z melanomu a stromálními fibroblasty. Používá *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a dále imunohistochemické porovnání exprese dílčích markerů u vytvořených modelů. Předkládaná práce má několik dílčích na sebe navazujících témat.

### a) Indukce kmenových znaků u melanomových linií

Cílem je vytvoření *in vitro* modelu přibližujícího se situaci ve tkáni při progresi nádoru v procesu metastazování a sledování změny fenotypu takto ovlivněných nádorových melanocytů. Součástí je i ověření, zda různé linie nádorových melanocytů reagují na změnu podmínek stejným způsobem.

### b) Sledování možného uniformního chování CAFs z různých typů kožních nádorů

V naší laboratoři bylo dříve zjištěno, že stromální fibroblasty z různých typů tumorů mají univerzální účinky na nádorové buňky (Dvořánková et al., 2012). Cílem tohoto okruhu je zjistit, zda nádorové buňky různého původu mají také uniformní účinky na CAFs. Analyzován bude vliv různých typů nádorových buněk na různé typy CAFs a sledováno chování těchto fibroblastů s důrazem na případné rozdíly mezi nimi. Účelem je také zjistit, zda CAFs izolované z melanomu reagují rozdílně než lépe typizované CAFs z nádorů dlaždicových epitelů.

### c) Popsání vlivu různých nádorových melanocytů na CAFs z různých melanomů

Tento okruh pokusů navazuje na předchozí téma. Cílem je zjistit, jakým způsobem v rámci melanomu ovlivňují nádorové buňky CAFs, zda působí uniformně a zda CAFs z různých melanomů reagují na stejné podněty obdobným způsobem.

### **3. METODY**

#### **3.1. OBECNÁ ČÁST**

##### **3.1.1. Použitá média a roztoky**

###### **Kultivační médium DMEM – příprava z 10x koncentrovaného média**

375 ml tkáňové vody (Biochrom, Berlín, Německo)

45 ml DMEM 10x (Biochrom, Berlín, Německo)

15 ml 7,5% roztoku NaHCO<sub>3</sub> (Biochrom, Berlín, Německo)

5 ml roztoku ATB 100x (Penicilin + Streptomycin, Biochrom, Berlín, Německo)

10 ml 200 mM roztoku glutaminu (Biochrom, Berlín, Německo)

50 ml fetálního hovězího séra (FBS, Biochrom, Berlín, Německo)

###### **Kultivační médium EMEM**

440 ml EMEM (Biochrom, Berlín, Německo)

5 ml roztoku ATB 100x

5 ml Hepes (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika)

50 ml FBS

###### **Kultivační médium McCoy's**

450 ml McCoy's 1x (Biochrom, Berlín, Německo)

5 ml roztoku ATB 100x

3,8 ml 200 mM roztoku glutaminu

50 ml FBS

###### **Kultivační médium M254**

100 ml média M254 (Gibco, Life Technologies Czech Republic s.r.o., Praha, Česká republika)

1 ml přídatku do média HMGS 100x (Gibco, Life Technologies Czech Republic s.r.o., Praha, Česká republika)

1 ml roztoku ATB 100x

**Fosfátový pufr (PBS) bez Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>** (pH 7,0–7,2 Biochrom, Berlín, Německo)

### **Etylendiamin-tetraoctová kyselina (EDTA) – 0,02%roztok**

2 ml EDTA (1% roztok, Biochrom, Berlín, Německo)

98 ml PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

### **Trypsin 0,25% roztok**

2,5% roztok(Biochrom, Berlín, Německo) naředěn 10x PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a zamražen po malých objemech v  $-20^{\circ}\text{C}$

Pro pasážování buněk:

0,25% roztok trypsinu + 0,02% roztok EDTA, 1:1

Pro rozvolnění tkání:

a) 0,25% roztok trypsinu

b) 6 ml 0,5% trypsinu

4 ml PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

0,25 ml roztoku gentamycinu

### **Gentamycin**

Zásobní roztok gentamycinu byl připraven rozpuštěním 50 mg gentamycin sulfátu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v 5 ml tkáňové vody. Vzniklý roztok o koncentraci 10 mg/ml byl sterilně rozplněn po aliquotech a zamražen v  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tento zásobní roztok byl přidáván v případě potřeby (zejména primokultury z tkání) do kultivačního média tak, aby byl zředěn 40x na výslednou koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Zamrazovací médium**

15 % dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika)

85 % FBS

Při zamrazování buněk se smíchá 1 díl buněčné suspenze a 2 díly zmrazovacího média

### **3.1.2. Použité buňky**

Všechny buňky, se kterými byly prováděny experimenty v rámci této diplomové práce, jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3: Buňky použité k pokusům, jejich zdroj a původ a kultivační médium.

Název	Typ buněk	Původ	Zdroj	Médium
Asc	Nádorové melanocyty	Dermatovenerologická klinika VFN a 1. LF UK	Ascites pacienta s mnohočetnými jaterními metastázami melanomu	DMEM
BLM	Nádorové melanocyty	Dar z Nizozemí (Department of Pathology, Radboud University Nijmegen Medical Centre)	Kožní metastázy vysoce agresivního melanomu	DMEM
FaDu	Nádorové keratinocyty	Koupená linie (ATCC, Cat. No. HTB-43)	Karcinom hypopharyngu	EMEM
G-361	Nádorové melanocyty	Koupená linie (ATCC, Cat. No. CRL-1424)	Kožní metastáza melanomu	McCoy
HF	Dermální fibroblasty	Klinika plastické chirurgie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady	Zbytková kůže po plastické operaci	DMEM
JAM	Stromální fibroblasty	Dermatovenerologická klinika VFN a 1. LF UK	Kožní metastáza melanomu	DMEM
MAM	Stromální fibroblasty	Dermatovenerologická klinika VFN a 1. LF UK	Kožní metastáza melanomu	DMEM
MelHP	Neonatální vysoce pigmentované melanocyty	Buněčná linie z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK	Prepuccium novorozence	M254
ZAM	Stromální fibroblasty	Dermatovenerologická klinika VFN a 1. LF UK	Kožní metastáza melanomu	DMEM

Všechny vzorky tkání, ze kterých byly dále používané buňky izolovány, byly získány s informovaným souhlasem pacientů, po schválení lokální Etickou komisí a v souhlasu s Helsinskou deklarací.

Zdravé kontrolní dermální fibroblasty (HF) byly získány ze zbytkové kůže při operaci gigantomastie na Klinice plastické chirurgie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Z materiálu byly tangenciálně seříznuty malé dermoepidermální štěpy, které byly přes noc inkubovány při 4 °C v 0,3% roztoku trypsinu. Poté byla oddělena epidermis od dermis. Z epidermis byla získána suspenze keratinocytů, které byly dále kultivačně namnoženy. Dermis byla rozkrájena na malé částky, které byly uloženy do kultivačních jamek a zakapány kultivačním médiem (DMEM). Fibroblasty migrující z malých kousků dermis byly následně sklizeny trypsinizací a kultivovány v DMEM při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Stromální fibroblasty z maligního melanomu byly připraveny z kožní metastázy odstraněné při paliativním zákroku u pacientů ve stadiu IV. Kožní metastáza byla rozkrájena

na malé kousky, které byly krátkodobě trypsinizovány (20 min, 37 °C), poté uloženy do kultivačních jamek a zakapány DMEM s gentamycinem.

Fibroblasty migrující z malých kousků dermis byly sklizeny a kultivovány v DMEM při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Homogenita získaných fibroblastů ze vzorků kůže či sliznice byla ověřena imunohistochemicky detekcí vimentinu, keratinů a melanocytových znaků (S100, HMB-45, Tyr). Použity byly pouze buňky vimentin pozitivní, keratin a melanocytové markery negativní.

Melanomová buněčná linie Asc byla připravena z ascitické tekutiny získané z paliativní punkce u pacienta s maligním melanomem ve stadiu IV s mnohočetnými jaterními metastázami. Ascitická tekutina byla vypuštěna do sterilních kyvet a centrifugována 5 minut na 1000 rpm. Získaná peleta byla promyta sterilním PBS s antibiotiky a suspenze byla opět zcentrifugována. Takto získané buňky byly resuspendovány v DMEM s gentamycinem a kultivačně pomnoženy.

### 3.1.3. Tkáňové kultury

Při všech výše uvedených izolacích byla vytvořena zásoba buněk z co nejnižší pasáže (většinou třetí pasáž), které byly zamrazeny a skladovány v parách kapalného dusíku pro další použití.

#### 3.1.3.1. Kultivace buněk

Veškeré manipulace s buňkami byly prováděny v laminárním boxu s vertikálním prouděním (Kendro, Německo) za přísně sterilních podmínek. Buněčné kultury byly kultivovány v lahvích, miskách či jamkách z kultivačního plastiku. Buňky byly nasazeny v potřebné hustotě ve formě homogenní suspenze do příslušné nádoby a pěstovány v inkubátoru (Sanyo, Japonsko) v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C. Média používaná pro jednotlivé buňky jsou uvedena v tabulce 3. Kultivační médium bylo měněno třikrát týdně. Růst buněk a jejich morfologie byly pravidelně kontrolovány v mikroskopu Nikon EclipseTS100 (Nikon, Japonsko).

Kokultivace jsou společné kultivace různých typů buněk v jednom prostředí. Při přímých kokultivacích byly oba typy buněk kultivovány dohromady tak, že byly v přímém kontaktu. Do kultivační nádoby byly nasazeny první buňky. Po jejich uchycení (nejlépe druhý den) byl přidán druhý typ buněk a dále byly kultivovány společně.

Při nepřímých kokultivacích byly oba typy buněk kultivovány společně, oddělené semipermeabilní membránou, takže vzájemné ovlivnění bylo možné pouze parakrinní cestou. Do kultivačních jamek byly nasazeny první buňky. Po jejich uchycení (za přibližně čtyři hodiny) byl do jamky vložen inzert a do něho byla nakapána suspenze druhých buněk. Dále byly oba typy buněk kultivovány v jednom společném médiu.

Pro kultivaci buněk v neadhezivním prostředí buněk používány jamky s neadhezivním povrchem, který neumožňuje přichycení buněk. Buňky během 24 až 48 hodin vytvořily sféry, které plavaly v médiu a postupně se zvětšovaly. Výměna média byla prováděna jednou za tři dny, desky byly umístěny šikmo, aby sféry sedimentovaly u hrany jamky. Většina média byla s opatrností odsáta jehlou a následně bylo přidáno čerstvé médium.

Příprava kondiciovaných médií probíhala následovně. Buňky, ze kterých bylo sbíráno kondiciované médium (KM), byly nasazeny do 75 cm<sup>2</sup> kultivační lahve (TPP Techno Plastic Product, Trasadingen, Švýcarsko). Při dosažení 60% konfluence porostu bylo odsáto médium a přidáno 20 ml čerstvého média. Po 24 hodinách bylo médium sebráno, centrifugováno (1000 rpm, 4 min) a nakonec přefiltrováno přes stříkačkový mikrofiltér 0,2 µm (Corning Life Sciences, Schiphol Rijk, Nizozemsko). Takto připravené médium bylo použito čerstvé nebo zmrazeno při -20 °C. Při větší potřebě média bylo použito více lahví s buňkami a byl vytvořen jeden homogenní vzorek, který byl následně rozplněn na aliquoty.

#### *3.1.3.2. Pasážování buněk*

Pasážování buněk bylo prováděno při dosažení konfluentního porostu nebo při nasazování experimentu. Kultivační médium bylo odlito, buňky byly opláchnuty PBS, aby se odstranily zbytky kultivačního média, a následně i 0,02% roztokem EDTA. Buňky byly odvolněny směsí 0,25% trypsinu a 0,02% EDTA v poměru 1:1 při 37 °C. Poté bylo přidáno malé množství média k zastavení působení trypsinu a buňky v něm byly resuspendovány. Počet buněk v získané suspenzi byl určen počítáním v Bürkerově komůrce na mikroskopu Nikon EclipseTS100.

#### *3.1.3.3. Příprava skel pro imunohistochemickou detekci*

Při poslední pasáži před usušením byly buňky přeneseny na sterilní skla umístěná do kultivačních jamek příslušné velikosti. Buňky se na skla přichytily a byly na nich kultivovány až do usušení. Po dosažení ideálního porostu bylo odsáto médium, buňky třikrát opláchnuty



PBS, skla byla vyjmuta z kultivačních jamek a usušena v laminárním boxu. Poté byla skladována v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do okamžiku barvení buněk.

#### 3.1.3.4. *Zamrazování a rozmrazování buněk*

Buňky v konfluentním porostu byly trypsinizovány, následně sklizeny do suspenze a spočítány v Bürkerově komůrce v mikroskopu Nikon EclipseTS100. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 minut při 1000 otáčkách. Buněčná peleta byla resuspendována v médiu a přidáno zamrazovací médium tak, aby výsledná koncentrace DMSO byla cca 10% a počet buněk asi  $0,5 - 1 \times 10^6$  buněk/ml. Do každé zamrazovací kyvety byl napipetován 1 ml buněčné suspenze a kyvety byly ihned uloženy do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně skladovány trvale v kapalném dusíku.

Při rozmrazování byla kyveta s buňkami vyjmuta ze zamrazovacího kontejneru s kapalným dusíkem a rozmrazena ve vlažné vodě. Buňky byly jemně rozfoukány injekční stříkačkou a obsah celé kyvety byl přenesen do kultivační láhve a zalit médiem. Po přichycení buněk bylo kultivační médium vyměněno, aby se odstranil přítomný DMSO.

#### 3.1.4. MTT test

Test odráží míru metabolické aktivity buněk a princip je založen na faktu, že při buněčném dýchání je v mitochondriích enzymy dýchacího řetězce redukována účinná látka, žlutý MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid –  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$ , na modrou sraženinu formazanu 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenylformazan  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$ , který zůstává ve formě nerozpustných granulí uvnitř buňky. Tato modrá sraženina je vhodným rozpouštědlem převedena do roztoku a hodnota absorbance je úměrná jak počtu buněk, tak jejich metabolické aktivitě.

MTT (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) byl navážen a rozpuštěn v bezsérovém DMEM tak, aby vznikl roztok o koncentraci 5mg/ml. Ten byl skladován při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a těsně před použitím byl šestkrát naředěn sérovým kultivačním médiem (výsledná koncentrace 0,83 mg/ml). Z buněčné kultury bylo odsáto médium, na buňky byl aplikován roztok MTT a následně byly inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$  2,5 hodiny. Poté byl odstraněn roztok MTT a vzniklá modrá sraženina (intracelulární modrý formazanový produkt) byla rozpuštěna v příslušném objemu DMSO (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). 200  $\mu\text{l}$  modrého roztoku bylo poté přeneseno do 96-jamkové desky (od každého vzorku vždy dublet) a byla změřena

absorbance při 570 nm na Universal MicroplateReader EL 800 (BioTek, Winooski, USA). Jako referenční vzorek (blank) bylo použito 200 µl DMSO.

### 3.1.5. Imunohistochemie

Všechny protilátky, které byly použity k experimentům v rámci této diplomové práce, jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4: Primární a sekundární protilátky použité k pokusům, jejich výrobce a specifická.

Primární protilátka	Polyklonální/monoklonální	Výrobce	Sekundární protilátka	Výrobce	Fluorochrom
α-SMA	monoklonální	(M0851) DAKO, Glostrup, Dánsko	Goat anti-mouse	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
CD271	polyklonální	(A26540) Atlas Antibodies, Stockholm, Švédsko	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Denmark	FITC
DAPI	-	Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika	-	-	-
Fibronectin	polyklonální	(Q0149) DAKO, Glostrup, Dánsko	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Galectin-1	polyklonální	(ab25138) Abcam, Cambridge, UK	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
HMB-45	monoklonální	(1037-461A) Invitrogen, Camarillo, CA, USA	Goat anti-mouse	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
Keratiny (široké spektrum)	polyklonální	(ab9377) Abcam, Cambridge, UK	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Keratin-19	monoklonální	(M0888) DAKO, Glostrup, Dánsko	Goat anti-mouse	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
Keratin-8	polyklonální	(310248) Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Ki-67	monoklonální	(M7240) DAKO, Glostrup, Dánsko	Goat anti-mouse	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
Nanog	polyklonální	(AF1997) R&D, UK&Europe, Abingdon, UK	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Nestin	monoklonální	(ab22035) Abcam, Cambridge, UK	Goat anti-mouse	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
Nestin	polyklonální	(A35228) Sigma-Aldrich, Praha, Česká	Swine anti-rabbit	DAKO, Glostrup,	FITC

		republika		Dánsko	
Oct4	polyklonální	(30476) BioVision, California, USA	Swine anti- rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
S100	polyklonální	(Z0311) DAKO, Glostrup, Dánsko	Swine anti- rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Sox2	polyklonální	(ab15830) Abcam, Cambridge, UK	Swine anti- rabbit	DAKO, Glostrup, Dánsko	FITC
Tenascin	monoklonální	(T2551) Sigma- Aldrich, Praha, Česká republika	Goat anti- mouse	Sigma- Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC
Vimentin	monoklonální	(N1521) DAKO, Glostrup, Dánsko	Goat anti- mouse	Sigma- Aldrich, Praha, Česká republika	TRITC

TRITC –tetrametylrodamin-isothiokyanát; FITC – fluorescein isothiokyanát; DAPI – 4,6-diamidino-2-fenylindol; swine anti-rabbit – prasečí protilátka proti králíčím antigenům; goat anti-mouse – kozí protilátka proti myším antigenům

Tab. 5: Postup fixace vzorků pro imunohistochemii.

Látka	Doba v minutách
PBS	5
Triton X-100	10
PBS	10
Paraformaldehyd	10
PBS	10
FBS	30
Primární protilátka	90
PBS	15, 15, 15
Sekundární protilátka	45
PBS	15, 15, 15
DAPI	1
PBS	15, 15, 15
Vectashield	-

Testované vzorky byly fixovány 4% pufovaným paraformaldehydem (pH 7.2–7.4) pět minut a opláchnuty PBS. Buňky byly permeabilizovány Tritonem X-100 (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a nespecifické nasedání protilátek bylo blokováno pomocí hovězího sérum albuminu a/nebo neimunním prasečím sérem – ty zabránily interakci Fc fragmentu imunoglobulinu s Fc receptorem. Postup fixace a barvení je shrnut v tabulce 5. Protilátky byly

ředěny tak, jak je doporučeno výrobcí; všechny protilátky jsou shrnuty v tabulce 4. Vzorky byly na podložní skla montovány Vectashieldem (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a skladovány v 4 °C. Poté byla data analyzována fluorescenčním mikroskopem Eclipse 90i (Nikon, Praha, Česká republika), který je vybaven filtry pro FITC, TRITC a DAPI, kamerou Cool-1300Q CCD (Vosskühler, Osnabrück, Německo) a systémem počítačové analýzy obrazu LUCIA 5.1 (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika).

### 3.2. PROVEDENÍ JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ

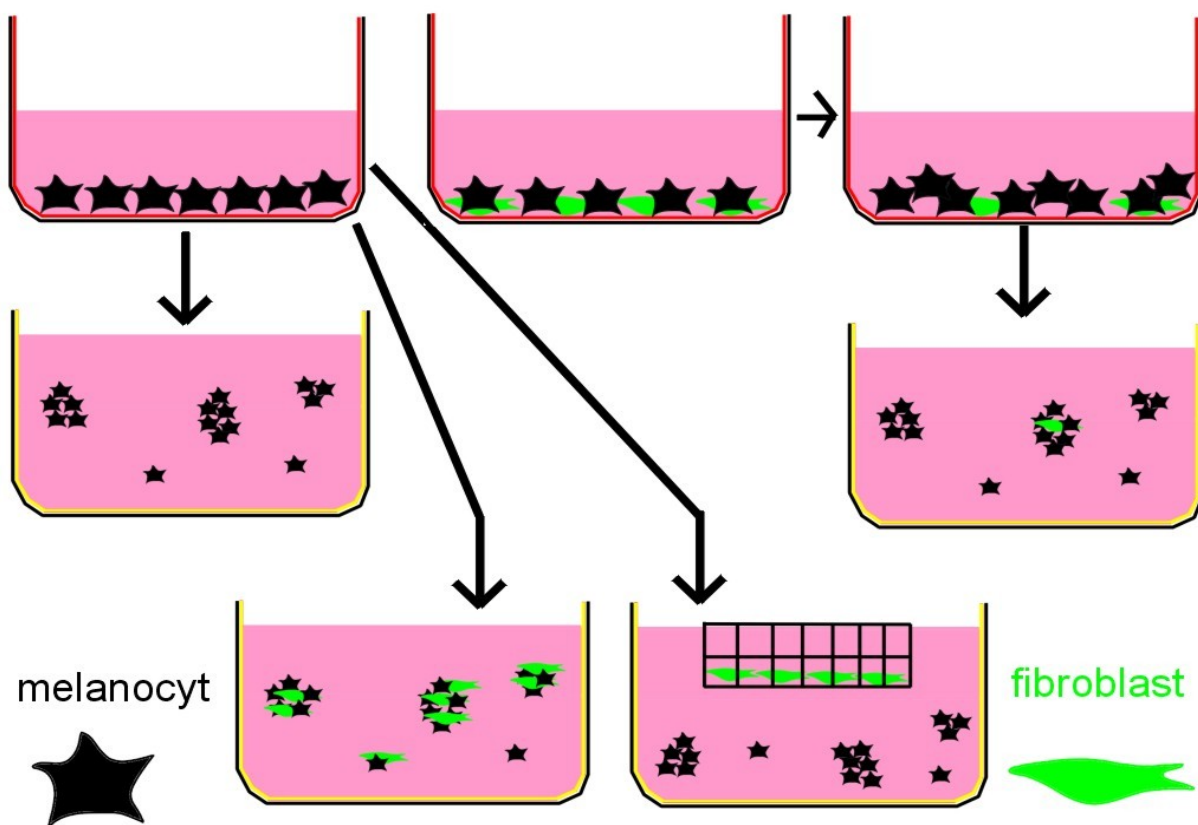
#### 3.2.1. Vliv neadhezivního prostředí a stromálních fibroblastů na fenotyp buněk různých melanomových linií

K pokusu byly použity stromální fibroblasty z kožní metastázy melanomu (JAM nebo ZAM) a nádorové melanocyty ze tří různých melanomů (Asc, BLM, G361), schéma pokusu je na obrázku. Kultivace v adhezivním prostředí probíhala jeden týden. Kontaminace fibroblastů melanocyty byla provedena při subkonfluentním porostu a to v počtu 100 melanocytů/cm<sup>2</sup> a tato kokultivace v adhezivním prostředí probíhala tři týdny. Buňky byly přeneseny do neadhezivního prostředí v počtu 10000 na jamku (asi 5000/ml), tedy v případě přímé kokultivace dvou typů buněk 5000 melanocytů a 5000 fibroblastů na jamku. Kultivace v neadhezivním prostředí probíhala jeden týden. Jako kontrola byly použity zdravé dermální fibroblasty a jeden typ nádorových melanocytů (BLM). Postup při kultivaci byl identický jako při práci s JAM. Schéma pokusu je znázorněno na obrázku 2.

Imunohistochemicky byly typizovány:

- Samotné melanocyty v adhezivním prostředí (např. Adh. BLM)
- Samotné melanocyty v neadhezivním prostředí (např. Neadh. BLM)
- Melanocyty v přímém kontaktu s fibroblasty v neadhezivním prostředí (např. Neadh. BLM+JAM)
- Melanocyty s fibroblasty v inzertu v neadhezivním prostředí (např. Neadh. BLM/JAM)
- Melanocyty přerůstající fibroblasty v adhezivním prostředí (např. Adh. JAM-co-BLM)
- Melanocyty přerůstající fibroblasty v neadhezivním prostředí (např. Neadh. JAM-co-BLM)

Poté byly buňky ze všech způsobů kultivace nasazeny na skla na 24 hodin, sklizeny a usušeny. Detekce specifických proteinů byla provedena pomocí nepřímé imunofluorescence.



Obr. 2: V levé části pokusu byly melanocyty kultivovány samotné v adhezivním prostředí a poté odvolněny a přeneseny do neadhezivního prostředí ve třech různých kombinacích – samotné, s přidáními fibroblasty v přímém kontaktu a s přidáními fibroblasty v inzertu. V pravé části byly v adhezivním prostředí kokultivovány fibroblasty s nádorovými melanocyty. Nejprve byly nasazeny fibroblasty, po jejich adhezi byly kontaminovány nádorovými melanocyty, které je přerůstaly. Kokultura byla přenesena do neadhezivního prostředí.

### 3.2.2. Srovnání růstového potenciálu, metabolické aktivity a produkce extracelulární matrix různých typů fibroblastů samotných a pod vlivem nádorových buněk

K pokusu byly použity tři typy fibroblastů – zdravé dermální (HF), stromálníze spinocelulárního karcinomu (S4) a stromální z melanomu (ZAM). Dále byly použity dva typy nádorových buněk – z melanomu (BLM) a spinocelulárního karcinomu (FaDu). Fibroblasty byly kultivovány samotné a pod vlivem nádorových buněk v inzertovém systému (Obr. 3). Sledování změny produkce extracelulární matrix, a to v krátkodobém horizontu jeden týden

a dlouhodobém tři týdny společné kultivace a zároveň sledování času zdvojení a metabolické aktivity pomocí MTT a počítání buněk – po 48, 96 a 168 hodinách.

#### *3.2.2.1. Sledování růstu buněk*

Jednotlivé fibroblasty byly nasazeny do 12-jamkových desek v hustotě ZAM 2500 buněk/cm<sup>2</sup>, HF 1500 buněk/cm<sup>2</sup>, S4 1500 buněk/cm<sup>2</sup>. Počet buněk byl optimalizován podle jejich růstové aktivity. Po třech hodinách (fibroblasty již adherovaly) byly do příslušných jamek vloženy inzerty a do nich nasazeny buď BLM v počtu 3000 buněk/inzert, nebo FaDu v počtu 5000 buněk na inzert. Počty nádorových buněk byly voleny tak, aby buňky během týdne dosáhly konfluentního porostu. Kultivační médium (DMEM s 10% FBS) bylo měněno vždy po 48 hodinách. Po 48, 96 a 168 hodinách byl stanoven počet buněk. Pro každý časový interval byly vždy dvě jamky a tudíž dvě získané hodnoty. Buňky byly odvolněny trypsinizací, převedeny do suspenze o objemu 1 ml a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky.

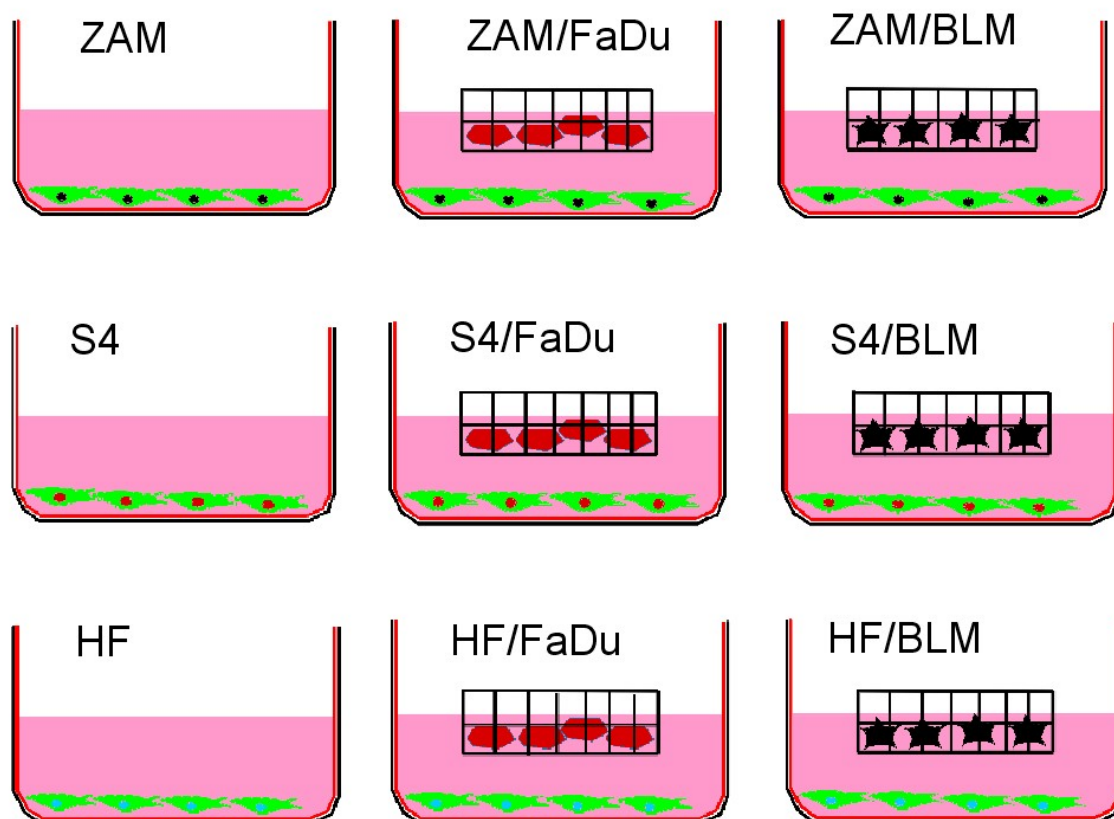
#### *3.2.2.2. Stanovení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu*

Fibroblasty byly nasazeny stejným způsobem jako při počítání buněk (viz výše) a jejich metabolická aktivita byla stanovena po stejných časových úsecích (48, 96, 168 hodin). Pro každý časový interval byly nasazeny vždy tři jamky. Kultivační médium (DMEM s 10% FBS) bylo měněno vždy po 48 hodinách. Při provedení testu byl do každé jamky aplikován 1 ml kultivačního média s MTT o koncentraci 0,83 mg/ml. Buňky byly uloženy do inkubátoru na dobu 2,5 hodiny, poté bylo odsáto médium a vzniklá modrá sraženina byla rozpuštěna ve 2 ml DMSO. Z každé jamky byly odebrány dva vzorky po 200 µl a byla změřena jejich absorbance při 570 nm.

#### *3.2.2.3. Sledování produkce extracelulární matrix v intervalu 7 a 21 dní*

Fibroblasty byly nasazeny do 12-jamkových desek v hustotě ZAM 2500 buněk/cm<sup>2</sup>, HF 1500 buněk/cm<sup>2</sup>, S4 1500 buněk/cm<sup>2</sup>. Počet buněk byl optimalizován podle jejich růstové aktivity. Pro časový interval jeden týden byla do jamek vložena krycí sklíčka o průměru 20 mm. Za tři hodiny byly do příslušných jamek vloženy inzerty a do nich nasazeny nádorové buňky v počtu FaDu – 5000 buněk, BLM – 3000 buněk. Kultivační médium (DMEM s 10% FBS) bylo měněno vždy po 48 hodinách. Po jednom týdnu byla skla z krátkodobé kultivace usušena a zmrazena pro imunohistochemickou detekci. Souvislý porost buněk v jamkách byl ztrypsinizován, buňky byly nasazeny za stejných podmínek do nových jamek a kultivovány za stejných

podmínek další týden. Poté byly buňky opět odvolněny, nasazeny na krycí skla a kultivovány poslední týden. Skla byla usušena a zamražena. Imunohistochemická detekce jednotlivých znaků pro dlouhodobou i krátkodobou kultivaci byla prováděna najednou.



Obr. 3: Tři různé typy fibroblastů byly kultivovány nejdříve samotné, poté k nim byly v inzertu přidány nádorové buňky ze spinocelulárního karcinomu a z melanomu.

### 3.2.3. Sledování růstového potenciálu, tvorby extracelulární matrix a přechodu v myofibroblasty různých stromálních fibroblastů z melanomu – indukce vlivem kondiciovaných médií ze zdravých a nádorových melanocytů

K pokusu byly použity fibroblasty izolované z kožní metastázy melanomu dvou různých pacientů (ZAM, MAM) a jako kontrola zdravé dermální fibroblasty (HF). Byla připravena kondiciovaná média (základ DMEM s 10% FBS) ze čtyř typů buněk – z nádorových melanocytů (Asc, BLM, G361) a vysoce pigmentovaných neonatálních melanocytů (MelHP). Z každého typu buněk bylo získáno 250 ml média, které bylo rozplněno po 15 ml a zamraženo. Jako kontrolní médium bylo použito D-MEM. Kombinace buněk a kondiciovaných médií je přehledně uvedena v tabulce 6.

Tab. 6: Tabulka zobrazuje kombinace použitých fibroblastů a buněk, ze kterých byla získána kondiciovaná média.

Fibroblasty/Média	DMEM	MeIHP	Asc	BLM	G361
HF	HF/DMEM	HF/MeIHP	HF/Asc	HF/BLM	HF/G361
ZAM	ZAM/DMEM	ZAM/MeIHP	ZAM/Asc	ZAM/BLM	ZAM/G361
MAM	MAM/DMEM	MAM/MeIHP	MAM/Asc	MAM/BLM	MAM/G361

Buňky byly nasazeny v počtu 750 buněk/cm<sup>2</sup> (1500 buněk na jamku) do 24-jamkových desek. Při krátkodobé kultivaci a byly kultivovány v krátkodobě (11 dní) a dlouhodobě (21 dní) pod vlivem kondiciovaných médií. V obou časových úsecích bylo ještě rozlišeno, zda se u buněk sledovala změna exprese znaků charakterizujících růstový potenciál nebo produkce extracelulární matrix a změna v myofibroblasty. V prvním případě byly buňky na sklech kultivovány pouze čtyři dny, aby byly zachyceny ve fázi maximálního růstu. Naopak pro detekci extracelulární matrix byly buňky na sklech kultivovány celých 11 dní, aby se její produkce mohla plně projevit. Fibroblasty z krátkodobé kultivace, u nichž byla sledována produkce extracelulární matrix, byly nasazeny rovnou na skla a 11 dní kultivovány. Fibroblasty z krátkodobé kultivace, u nichž se sledovala exprese znaků dediferenciace, byly pasážovány po sedmi dnech v jamce a poté přeneseny na čtyři dny na skla. Fibroblasty z dlouhodobé kultivace, u nichž byla sledována produkce extracelulární matrix, byly 10 dní kultivovány v jamce a poté 11 dní na sklech. Fibroblasty z dlouhodobé kultivace, u nichž se sledovala exprese znaků charakterizujících růstový potenciál, byly pasážovány dvakrát a až poté nasazeny na čtyři dny na skla. Výměna média probíhala jedenkrát za dva dny. Skla byla usušena a zamražena. Detekce specifických proteinů byla provedena pomocí nepřímé imunofluorescence najednou po ukončení celého experimentu.



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. VLIV NEADHEZIVNÍHO PROSTŘEDÍ A STROMÁLNÍCH FIBROBLASTŮ NA FENOTYP BUNĚK RŮZNÝCH MELANOMOVÝCH LINIÍ

Cílem tohoto experimentu bylo studovat vliv neadhezivního prostředí, či kombinace neadhezivního prostředí a stromálních fibroblastů na fenotyp melanomových buněk. K pokusu byly použity nádorové melanocyty ze tří různých melanomů (Asc, BLM, G361) a stromální fibroblasty z kožní metastázy melanomu (JAM nebo ZAM). V případě BLM byl proveden i kontrolní pokus, ve kterém byly stromální fibroblasty nahrazeny zdravými dermálními fibroblasty (HF).

Nádorové melanocyty byly umístěny na sedm dní do neadhezivního prostředí, samotné či ovlivněné stromálními fibroblasty a vzniklé sféry byly přeneseny na skla, kde proběhla 24 hodinová adheze. Sledována byla exprese znaků různého stupně dediferenciace a kmenovosti (CD271, Nanog, Nestin, Oct4, Sox2), znaků charakteristických pro melanocyty (HMB-45, S100) a cytokeratinů. Byly zjištěny velké rozdíly mezi chováním jednotlivých linií nádorových buněk, pro přehlednost je hodnocení exprese popsáno pro každou linii zvlášť.

BLM rostoucí v adhezivním prostředí jsou relativně málo rozprostřené, velmi rychle proliferující buňky. G361 jsou delší, protáhlé buňky. Asc mají téměř epitelovou morfologii. Linie G361 i Asc rostou podstatně pomaleji než linie BLM (Obr. 4).

V neadhezivním prostředí vytvořily buňky všech nádorových linií v průběhu 24 hodin shluky, které se následně formovaly v zakulacené sféry, které se během týdenní kultivace dále zvětšovaly. Buňky Asc a G361 tvořily menší a kompaktní jednotlivé sféry, zatímco v případě BLM docházelo k následnému spojování jednotlivých sfér v obrovské shluky. Přítomnost stromálních fibroblastů, ať již přímá, či v inzertu, rychlost tvorby sfér a jejich kompaktnost zvýšila, což se pozitivně projevilo i při jejich přenosu na skla. Ve všech případech a u všech linií si buňky uchovaly i po týdenním pobytu v neadhezivním prostředí viabilitu a po přenesení do adhezivního prostředí byly schopné během 24 hodin adherovat a migrovat ze sfér (Obr. 4). Právě u těchto migrujících buněk byl studován jejich fenotyp.

BLM začaly produkovat keratiny, pokud byly kokultivovány se stromálními fibroblasty v neadhezivním prostředí (Neadh. BLM+JAM) a slabě také u BLM přerůstající JAM v adhezivním prostředí (Adh. JAM-co-BLM). Pokud však byly tyto buňky vystaveny

neadhezivnímu prostředí, došlo ke ztrátě této produkce. Také ve všech ostatních případech byla exprese keratinů negativní (Obr. 5). Samotné BLM slabě exprimují nestin. Ve všech případech, kde byl přímý kontakt BLM se stromálními fibroblasty, tedy v kombinaci Neadh. BLM+JAM, Neadh. JAM-co-BLM, Adh. JAM-co-BLM, došlo k výraznému nárůstu exprese nestinu. Pokud byly stromální fibroblasty pouze v inzertu (Neadh. BLM/JAM), byla exprese nestinu také pozitivní, stejně jako u samotných BLM, ať už v neadhezivním prostředí nebo v základní adhezivní kultivaci (Obr. 5).

V případě BLM buněk se objevila exprese znaků embryonálních kmenových buněk, Oct4 a Nanog, ve dvou případech. Tam, kde byly buňky BLM přímo kultivovány se stromálními fibroblasty a umístěny do neadhezivního prostředí (Neadh. BLM+JAM), a tam, kde byly po třítydenním přerůstání buněk BLM přes kulturu JAM buňky opět vloženy do neadhezivního prostředí (Neadh. JAM-co-BLM; Obr. 5). Ve všech ostatních případech byly tyto znaky negativní (není ukázáno). Další ze znaků embryonálních kmenových buněk Sox2 nebyl exprimován ani v jediném případě stejně jako povrchový znak CD271, charakteristický pro málo diferenciované buňky (není ukázáno).

Exprese melanocytárních markerů HMB-45 a S100 nebyla v žádném z případů detekována (není ukázáno). Všechny výsledky jsou souhrnně ukázány v tabulce 7.

Tab. 7: Vliv stromálních fibroblastů (JAM) a neadhezivního prostředí na fenotyp BLM – exprese CD271, Nanog, Nestin, Oct4, Sox2, HMB-45, S100 a keratinů. Kontrolní kultivace samotných melanocytů v adhezivním prostředí je zvýrazněna.

BLM	Keratiny	Nestin	CD271	Nanog	Oct4	Sox2	HMB-45	S100
<b>Adh. BLM</b>	–	<b>+/-</b>	–	–	–	–	–	–
Neadh. BLM	–	+/-	–	–	–	–	–	–
Neadh. BLM+JAM	+/-	+	–	+	+	–	–	–
Neadh. BLM/JAM	–	+/-	–	–	–	–	–	–
Adh. JAM-co-BLM	+	+	–	–	–	–	–	–
Neadh. JAM-co-BLM	–	+	–	+	+	–	–	–

+ (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

Při provedení kontrolního pokusu, kde byly místo JAM použity zdravé lidské fibroblasty, nedošlo k žádné změně fenotypu BLM. Pouze v případě nestinu jakákoliv přítomnost fibroblastů zvýšila jeho expresi (Obr. 6). Expresе všech znaků je opět shrnuta v tabulce 8.

Tab. 8: Vliv zdravých dermálních fibroblastů (HF) a neadhezivního prostředí na fenotyp BLM – exprese CD271, Nanog, Nestin, Oct4, Sox2, HMB-45, S100 a keratinů. Kontrolní kultivace samotných melanocytů v adhezivním prostředí je zvýrazněna.

BLM	Keratiny	Nestin	CD271	Nanog	Oct4	Sox2	HMB-45	S100
<b>Adh. BLM</b>	–	<b>+/-</b>	–	–	–	–	–	–
Neadh. BLM	–	+	–	–	–	–	–	–
Neadh. BLM+HF	–	+	–	–	–	–	–	–
Neadh. BLM/HF	–	+	–	–	–	–	–	–
Adh. HF-co-BLM	–	+	–	–	–	–	–	–
Neadh. HF-co-BLM	–	+	–	–	–	–	–	–

+ (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

U linie G361 nebyla exprese keratinů ani nestinu zaznamenána v buňkách v žádné z kultivačních podmínek. CD271 ovšem exprimován byl, nejsilněji v případech, kde došlo k ovlivnění melanocytů přímým kontaktem se stromálními fibroblasty (Neadh. G361+JAM, Adh. JAM-co-G361, Neadh. JAM-co-G361), a slabší pozitivita byla pozorována i při nepřímém ovlivnění buněk (Neadh. G361/JAM), samotné melanocyty v neadhezivním prostředí (Neadh. G361) CD271 exprimovaly velmi slabě (Obr. 7).

Oct4 a Nanog byly exprimovány u pouze buněk, kde došlo k třítydennímu přerůstání G361 přes stromální fibroblasty (Adh. JAM-co-G361). Přenesením do neadhezivního prostředí buňky tento znak ztratily (Neadh. JAM-co-G361) a nevyskytl se ani v ostatních kombinacích (Neadh. G361, Neadh. G361+JAM, Neadh. G361/JAM; Obr. 7). Ostatní znaky, tedy Sox2, HMB-45 a S100 nebyly detekovány v žádné z kultivačních podmínek a zůstávaly negativní (není ukázáno). Všechny výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.

Tab. 9: Vliv stromálních fibroblastů (JAM) a neadhezivního prostředí na fenotyp G361 – exprese znaků různého stupně dediferenciace a kmenovosti (CD271, Nanog, Nestin, Oct4, Sox2), znaků charakteristických pro melanocyty (HMB-45, S100) a keratinů. Kontrolní kultivace samotných melanocytů v adhezivním prostředí je zvýrazněna.

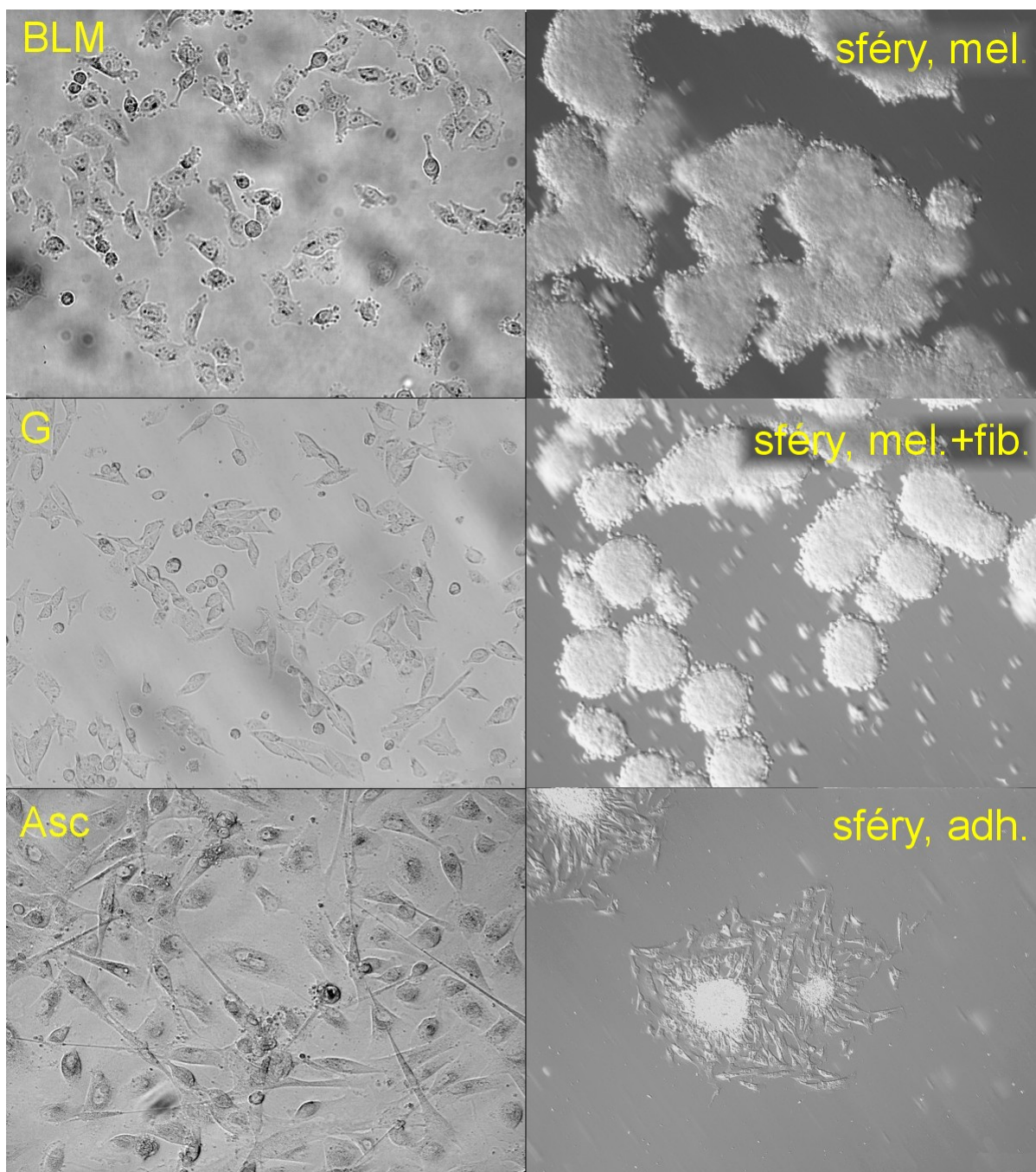
G361	Keratiny	Nestin	CD271	Nanog	Oct4	Sox2	HMB-45	S100
<b>Adh. G361</b>	–	–	+/-	–	–	–	–	–
Neadh. G361	–	–	+/-	–	–	–	–	–
Neadh. G361+JAM	–	–	+	–	–	–	–	–
Neadh. G361/JAM	–	–	+	–	–	–	–	–
Adh. JAM-co-G361	–	–	+	+	+	–	–	–
Neadh. JAM-co-G361	–	–	+	–	–	–	–	–

+ (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

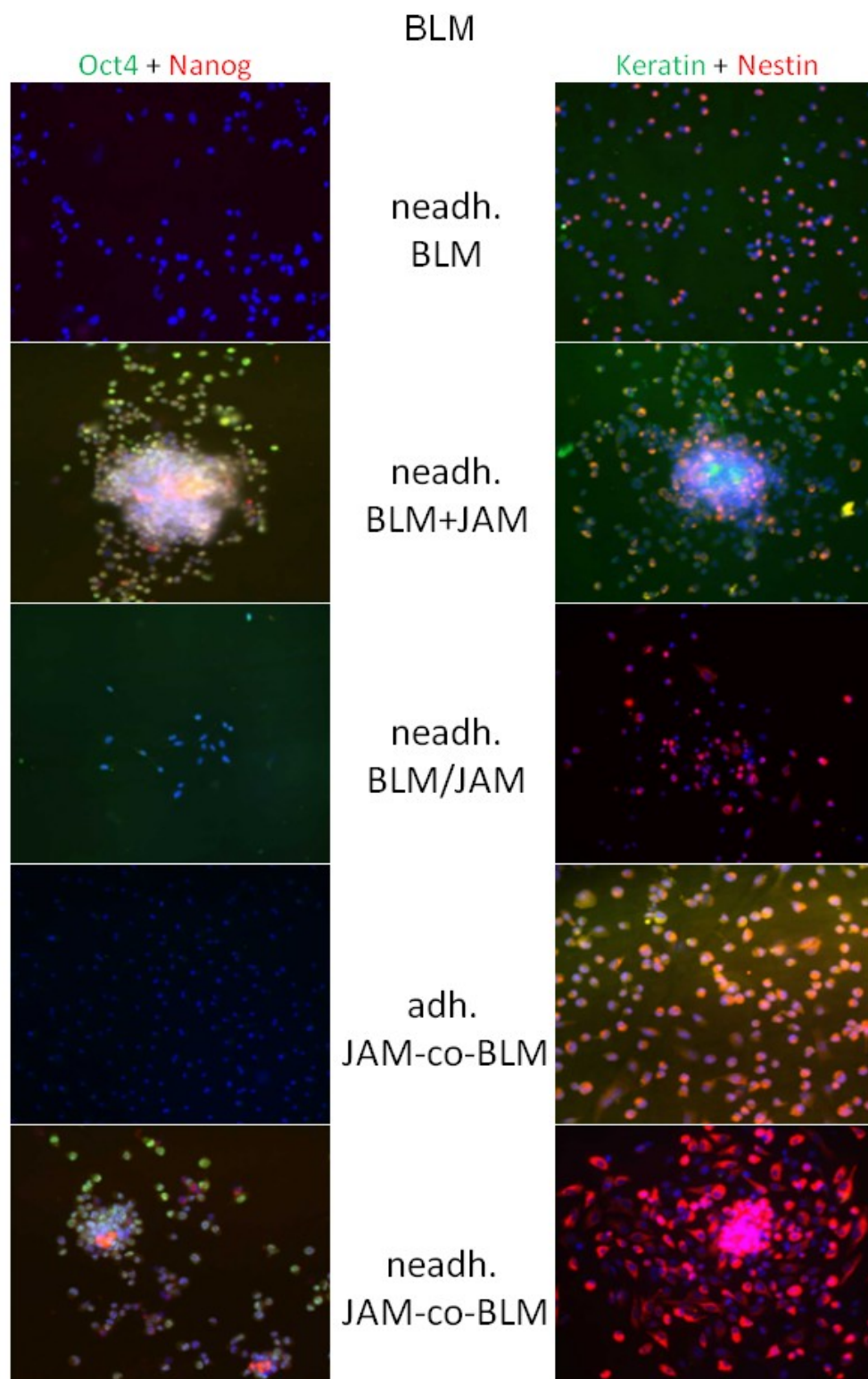
V linii Asc byly keratiny detekovány ve všech typech kultivace (Obr. 8), nicméně byla pozorována pouze lehká změna oproti původnímu fenotypu melanocytů v adhezivním prostředí (Adh. Asc), kde byla nalezena také slabá pozitivita. Nestin ani CD271 nebyly detekovány v žádném typu kultivace, stejně jako Oct4 a Nanog (Obr. 8). Sox2, HMB-45 a S100 byly ve všech případech negativní, jak tomu bylo i u ostatních sledovaných nádorových melanocytů. Všechny výsledky z kultivace Asc jsou shrnuty v tabulce 10.

Tab. 10: Vliv stromálních fibroblastů (ZAM) a neadhezivního prostředí na fenotyp Asc – exprese znaků různého stupně dediferenciace a kmenovosti (CD271, Nanog, Nestin, Oct4, Sox2), znaků charakteristických pro melanocyty (HMB-45, S100) a keratinů. Kontrolní kultivace samotných melanocytů v adhezivním prostředí je zvýrazněna.

Asc	Keratiny	Nestin	CD271	Nanog	Oct4	Sox2	HMB-45	S100
<b>Adh. Asc</b>	+	–	–	–	–	–	–	–
Neadh. Asc	+	–	–	–	–	–	–	–
Neadh. Asc+ZAM	+	–	–	–	–	–	–	–
Neadh. Asc/ZAM	+	–	–	–	–	–	–	–
Adh. ZAM-co-Asc	+	–	–	–	–	–	–	–
Neadh. ZAM-co-Asc	+	–	–	–	–	–	–	–

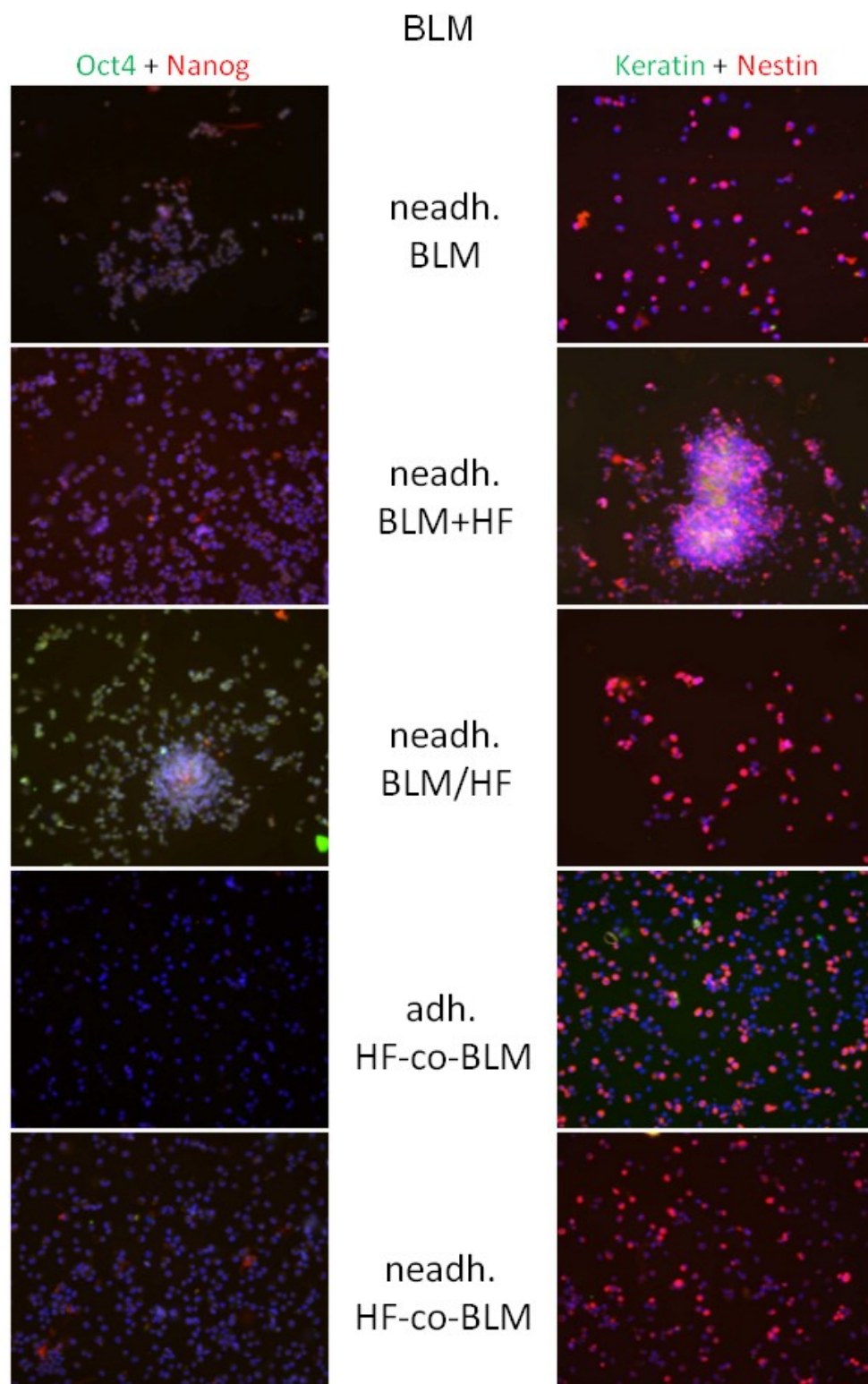


Obr. 4: V levém sloupci je ukázána morfologie nádorových melanocytů (BLM, G361, Asc) v adhezivním prostředí. V pravém sloupci je tvorba melanocytových sfér bez přítomnosti fibroblastů, v přítomnosti fibroblastů a migrace buněk ze sfér po přenesení do adhezivního prostředí. Políčko jednotlivých fotografií vlevo má reálnou velikost 1,8 mm, vpravo 0,9 mm.

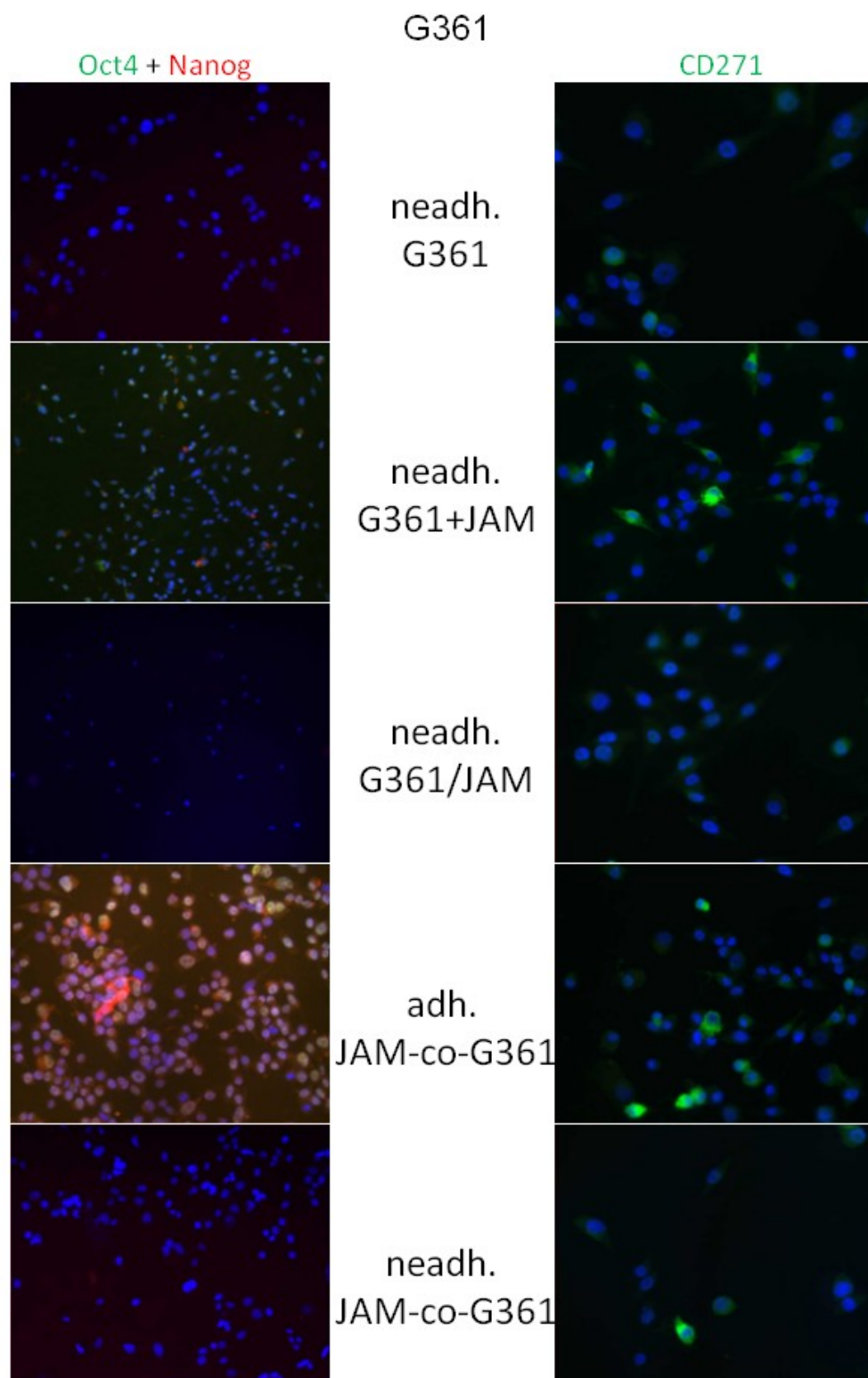


Obr. 5: Expres dediferenčních znaků u nádorových melanocytů (BLM) v různých kultivačních podmínkách (viz metody). V kokultivacích byly použity JAM (stromální fibroblasty z melanomu). Vlevo exprese Oct4 (zeleně) a Nanog (červeně), vpravo keratin (zeleně), nestin (červeně).



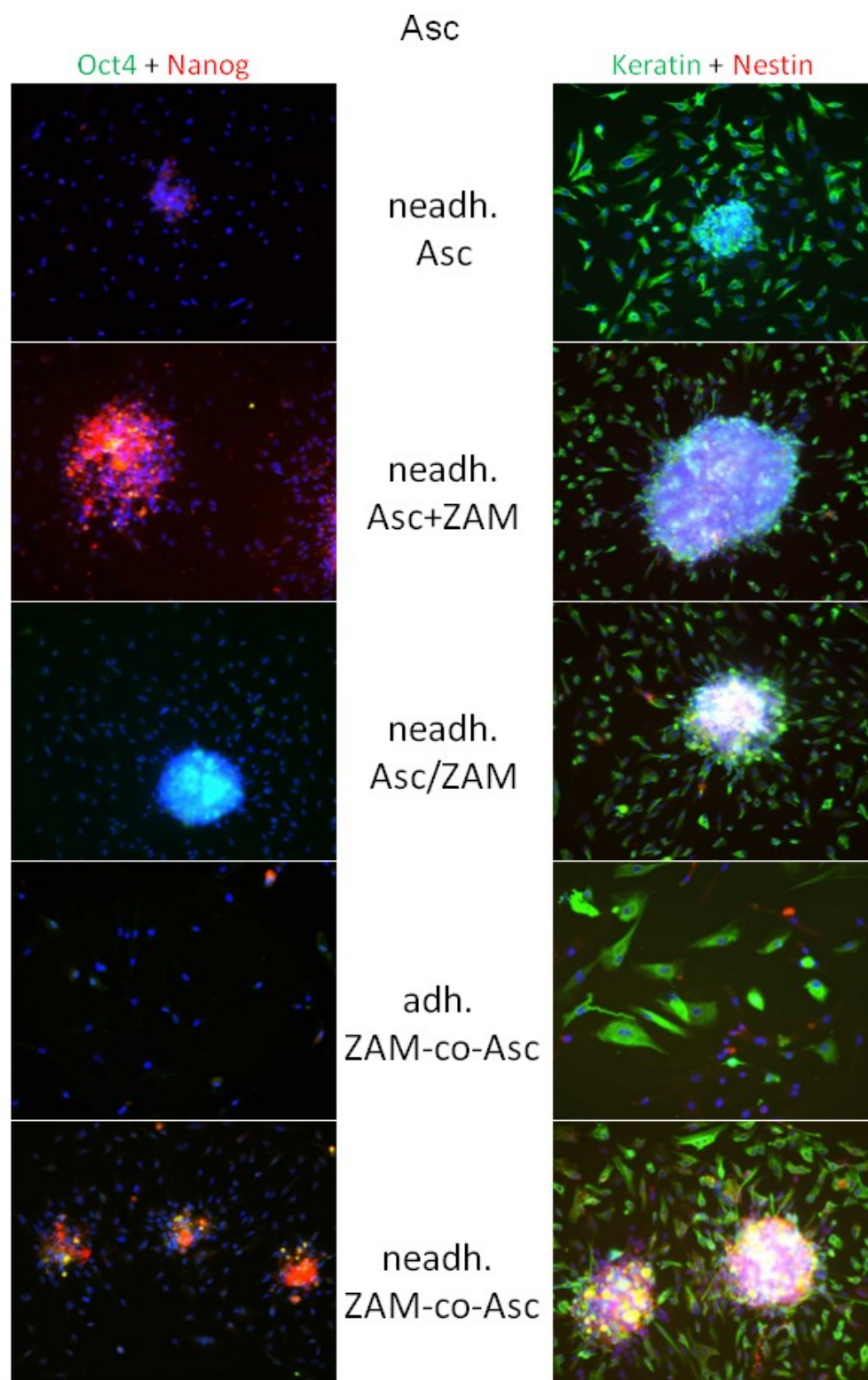


Obr. 6: Expres dediferenčních znaků u nádorových melanocytů (BLM) v různých kultivačních podmínkách (viz metody). V kokultivacích byly použity HF (zdravé dermální fibroblasty) jako kontrola. Vlevo exprese Oct4 (zeleně) a Nanog (červeně), vpravo keratin (zeleně), nestin (červeně).



Obr. 7: Expres dediferenčních znaků u nádorových melanocytů (G361) v různých kultivačních podmínkách (viz metody). V kokultivacích byly použity JAM (stromální fibroblasty z melanomu). Vlevo exprese Oct4 (zeleně) a Nanog (červeně), vpravo CD271 (zeleně).





Obr. 8: Expres dediferenčních znaků u nádorových melanocytů (Asc) v různých kultivačních podmínkách (viz metody). V kokultivacích byly použity ZAM (stromální fibroblasty z melanomu). Vlevo exprese Oct4 (zeleně) a Nanog (červeně), vpravo keratin (zeleně) a nestin (červeně).

#### 4.2. SROVNÁNÍ RŮSTOVÉHO POTENCIÁLU, METABOLICKÉ AKTIVITY A PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX RŮZNÝCH TYPŮ FIBROBLASTŮ SAMOTNÝCH A POD VLIVEM NÁDOROVÝCH BUNĚK

V pokusu byly použity zdravé dermální fibroblasty HF, stromální fibroblasty ze spinocelulárního karcinomu S4 a stromální fibroblasty z melanomu ZAM. Tyto fibroblasty byly kultivovány samotné, pod vlivem buněk FaDu (keratinocyty ze spinocelulárního karcinomu) a buněk BLM (melanocyty z melanomu). Byla sledována produkce extracelulární matrix (fibronektin, tenascin, galektin-1) a pomocí detekce hladkého svalového aktinu ( $\alpha$ -SMA) přítomnost aktivovaných myofibroblastů ve dvou časových intervalech jeden a tři týdny. Výsledky exprese jsou uvedeny v tabulkách 11 a 12. Byl sledován také růst buněk po dobu sedmi dnů a byl hodnocen pomocí stanovení počtu buněk a měření metabolické aktivity.

S4 stejně jako HF mají protáhlý vřetenovitý tvar a tvoří většinou přídatné výběžky. Naproti tomu ZAM jsou daleko rozprostřenější, mají více výběžků a nabývají morfologie připomínající myofibroblasty (Obr. 9).

Po 7 dnech kultivace (Obr. 10) vykazovaly všechny tři typy fibroblastů ve všech kombinacích alespoň slabou produkci fibronektinu. Nejvíce produkovaly fibronektin S4, nejméně ZAM, u kterých se v samostatné kultivaci vyskytoval pouze intracelulárně. FaDu ovlivnily produkci fibronektinu pozitivním směrem u S4 a ZAM, kokultivace HF s BLM produkci spíše tlumila, v případě ZAM byl efekt BLM na produkci fibronektinu pozitivní. V dlouhodobé kultivaci po 21 dnech (Obr. 11) byla alespoň slabá produkce fibronektinu přítomna u všech typů fibroblastů ve všech kombinacích. Nejvyšší produkci vykazovaly opět S4, v dlouhodobé kultivaci na ně ale nádorové buňky neměly pozitivní vliv. U samotných HF a ZAM a u HF a ZAM pod vlivem BLM byla exprese fibronektinu nalezena především intracelulárně. FaDu měly pozitivní vliv na produkci fibronektinu u ZAM a méně výrazně i u HF. Pod vlivem BLM se produkce fibronektinu posouvala více intracelulárně. Na rozdíl od sedmidenní kultivace nebyly po 21 dnech v případě HF žádné výrazné rozdíly v produkci ECM, naopak slabě vyšší pozitivita byla u HF kultivovaných pod vlivem nádorových buněk.

Produkce tenascinu byla po 7 dnech kultivace nalezena u HF za všech podmínek, u S4 také, nicméně BLM jeho produkci utlumovaly. Samotné ZAM tenascin neprodukovaly, ale kokultivace s nádorovými buňkami dokázala jeho produkci vyvolat, více FaDu, méně BLM.

U stromálních fibroblastů měla týdenní kokultivace na produkci ECM pozitivní vliv, zvyšovala se jak produkce ECM, tak bylo ovlivňováno i složení – vzrůstal podíl tenascinu v ECM. Naproti tomu u zdravých dermálních fibroblastů byl trend opačný – samotné fibroblasty měly produkci ECM nejvyšší. Rozdíl v produkci ECM samotných HF a kultivovaných pod FaDu byl minimální, pod BLM byl tento rozdíl mnohem znatelnější. U fibroblastů se snižovala zejména produkce fibronektinu, tenascin zůstával na podobné úrovni. Produkce tenascinu byla v dlouhodobé kultivaci oproti krátkodobé nalezena u všech fibroblastů ve všech kombinacích. U HF a ZAM kultivovaných samostatně a pod vlivem BLM byla exprese tenascinu nalezena pouze intracelulárně. FaDu měly pozitivní vliv na produkci tenascinu u HF a ZAM, S4 na rozdíl od krátkodobé kultivace nebyly nádorovými buňkami pozitivně ovlivněny.

V krátkodobé kultivaci po 7 dnech (Obr. 12) se exprese galektinu-1 neobjevila u žádných samostatně kultivovaných fibroblastů. S4 galektin-1 produkovaly pod vlivem nádorových buněk jen velmi málo. Slabá pozitivita značí nízkou produkci ale byla prokázána u HF a ZAM kultivovaných pod vlivem BLM a ZAM produkovaly galektin-1 i pod vlivem FaDu. ZAM začaly tedy produkovat galektin-1 pod vlivem nádorových buněk. Nádorové buňky měly na HF a S4 menší vliv. V dlouhodobé kultivaci po 21 dnech (Obr. 13) zůstala exprese galektinu-1 velmi ojediněle pozitivní u HF pod vlivem BLM. Stejně tak exprese galektinu-1 zůstala a dokonce vzrostla v případě ZAM pod vlivem FaDu. U ZAM kultivovaných pod BLM ale prakticky vymizela. Slabá pozitivita se nově objevila u S4 pod FaDu. Ve všech ostatních případech byla exprese galektinu-1 negativní.

V produkci  $\alpha$ -SMA se fibroblasty výrazně lišily. V krátkodobé kultivaci jej S4 neexprimovaly v žádném ze tří případů, naproti tomu ZAM se měnily v myofibroblasty samotné i pod vlivem FaDu a BLM, tedy bez ohledu na změnu prostředí. V HF byla produkce  $\alpha$ -SMA nalezena pouze pod vlivem BLM. Produkce  $\alpha$ -SMA v dlouhodobé kultivaci a tedy tvorba myofibroblastů nebyla ovlivněna kultivačními podmínkami a jednotlivé typy fibroblastů se chovaly uniformně. HF a S4 netvořily myofibroblasty v žádné z kombinací, ZAM je naopak tvořily ve všech třech případech. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a 12.

Je důležité zmínit, že k transformaci fibroblastů v myofibroblasty v *in vitro* podmínkách nedochází v kultuře rovnoměrně, ale vznikají jednotlivé okrsky myofibroblastů. Příložená

obrázková dokumentace této práce ukazuje právě taková místa a nevypovídá tedy nic o procentuálním zastoupení  $\alpha$ -SMA pozitivních buněk v celém pozorovaném vzorku.

Tab. 11: 7denní kultivace – porovnání produkce extracelulární matrix (fibronectin, tenascin, galektin-1) a přítomnosti aktivovaných myofibroblastů ( $\alpha$ -SMA) u tří druhů fibroblastů kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů a melanocytů.

7 dní	fibronectin	tenascin	galektin-1	$\alpha$ -SMA
HF	+	+	–	–
HF/FaDu	+	+	–	–
HF/BLM	+	+	+/-	+
S4	+	+	–	–
S4/FaDu	+	+	+/-	–
S4/BLM	+	+/-	+/-	–
ZAM	+/- IC	–	–	+
ZAM/FaDu	+	+	+	+/-
ZAM/BLM	+	+	+/-	+

IC (znak se vyskytuje intracelulárně); + (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

Tab. 12: 21denní kultivace – porovnání produkce extracelulární matrix (fibronectin, tenascin, galektin-1) a přítomnosti aktivovaných myofibroblastů ( $\alpha$ -SMA) u tří druhů fibroblastů kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů a melanocytů.

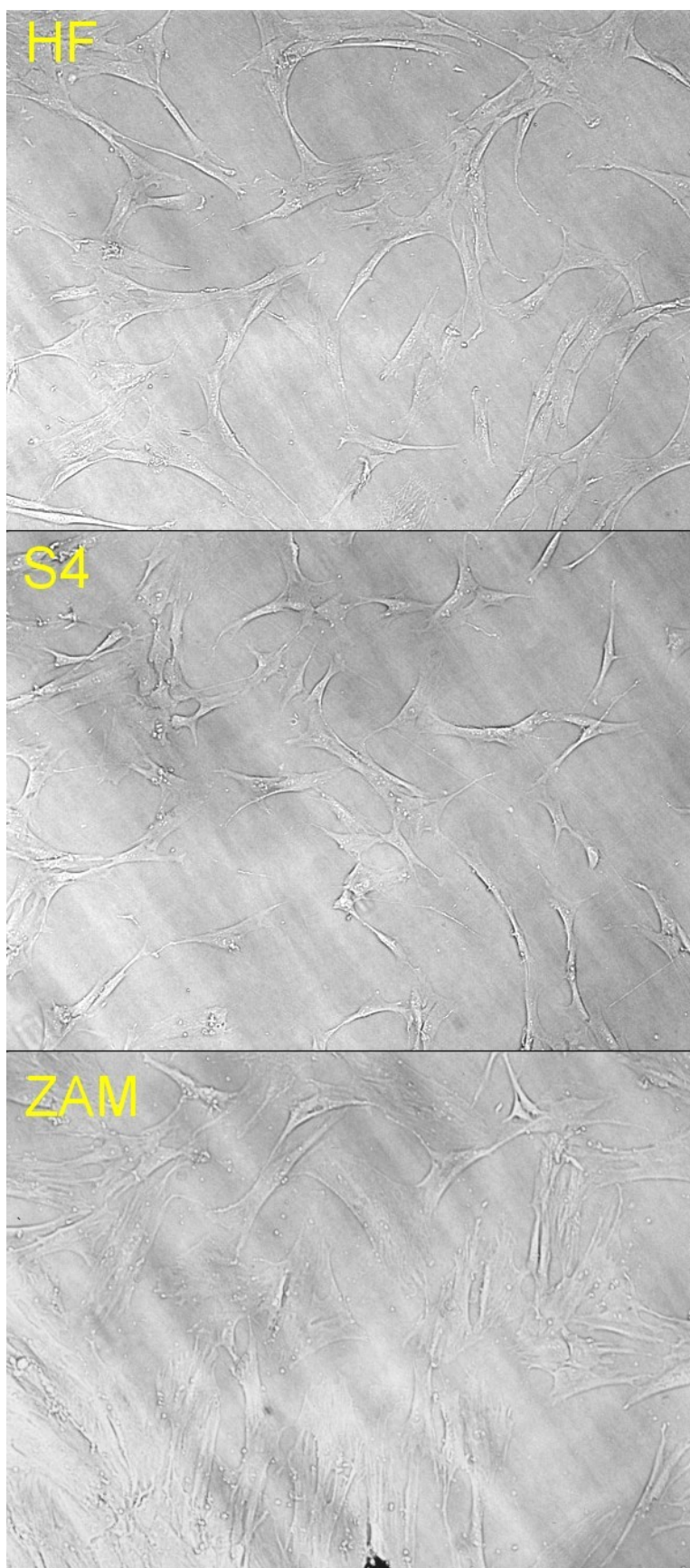
21 dní	fibronectin	tenascin	Galektin-1	$\alpha$ -SMA
HF	+ IC	+/- IC	–	–
HF/FaDu	+	+	–	–
HF/BLM	+ IC	+/- IC	+/-	–
S4	+	+/-	–	–
S4/FaDu	+	+/-	+/-	–
S4/BLM	+	+/-	–	–
ZAM	+/- IC	+/- IC	–	+
ZAM/FaDu	+	+	+	+
ZAM/BLM	+ IC	+/- IC	–	+

IC (znak se vyskytuje intracelulárně); + (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

Růstová křivka byla sestavena jak pomocí počítání buněk v Bürkerově komůrce, tak MTT testu v intervalu 48, 96 a 168 hodin (Obr. 14, 15, 16). Růstová křivka sestavená pomocí

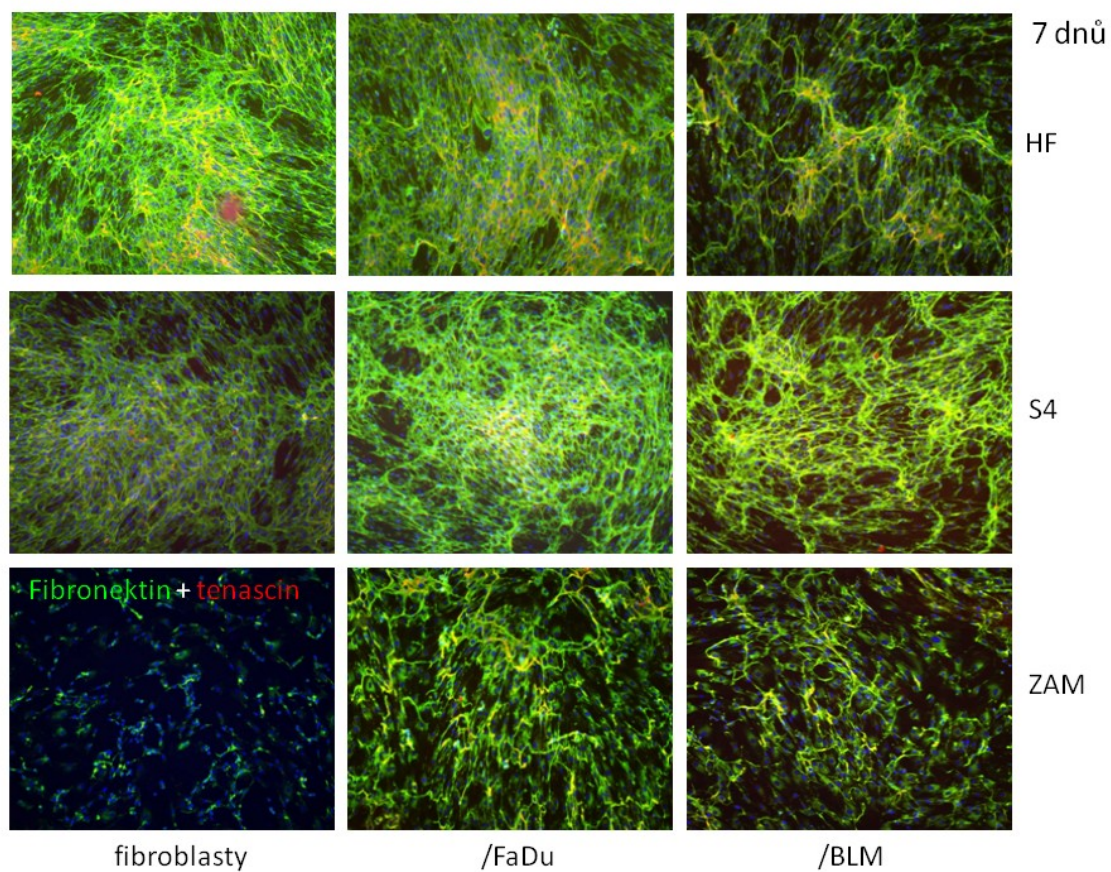
počítání buněk pro HF a S4 měla velmi podobný průběh. Buňky byly zachyceny v exponenciální fázi růstu. Průběh růstu samotných HF a S4 a pod vlivem FaDu a BLM byl podobný. HF i S4 rostly nejlépe pod vlivem FaDu, nejméně pod vlivem BLM, tyto rozdíly ale byly minimální. ZAM reagovaly ze začátku velmi podobně, ale po 168 hodinách se ukázal zcela opačný trend, kdy byl růst stromálních fibroblastů nádorovými buňkami oproti samostatné kultivaci tlumen. To platilo výrazněji pro BLM než pro FaDu.

Výsledky MTT testu dobře korelovaly s nárůstem počtu buněk v průběhu pokusu. Metabolická aktivita HF a S4 se výrazně nezměnila, pokud buňky byly vystaveny vlivu FaDu a BLM. Pouze u HF pod vlivem FaDu byla po 168 hodinách zjištěna vyšší metabolická aktivita. ZAM se opět chovaly zcela odlišně. Metabolická aktivita pod vlivem BLM nejdříve po 96 hodinách výrazně stoupla nad hodnoty ZAM samotných i kultivovaných pod FaDu, ale po delším čase působily BLM inhibičně a metabolická aktivita klesala. Podobný, i když mnohem méně výrazný trend se objevil u ZAM pod vlivem FaDu.

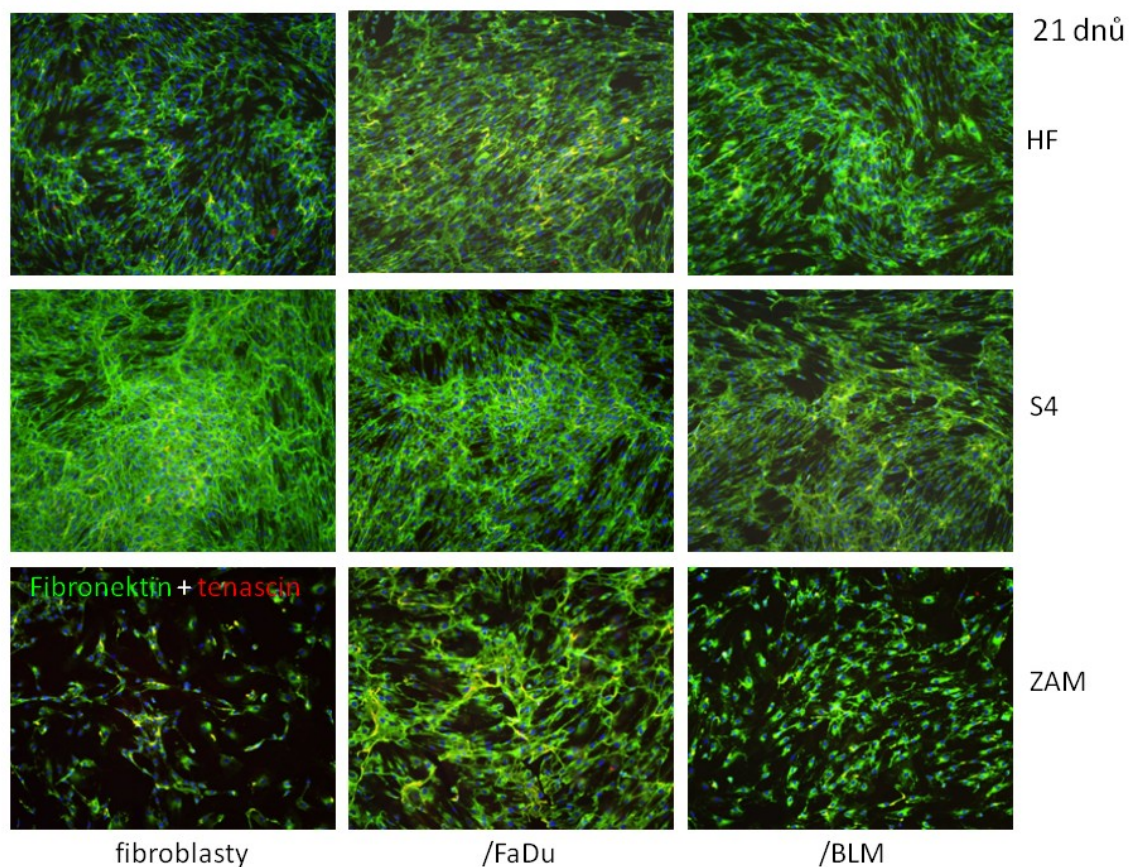


Obr. 9: Morfologie fibroblastů (HF, S4, ZAM) ve světelném mikroskopu. Políčko fotografií má šířku 0,9 mm.



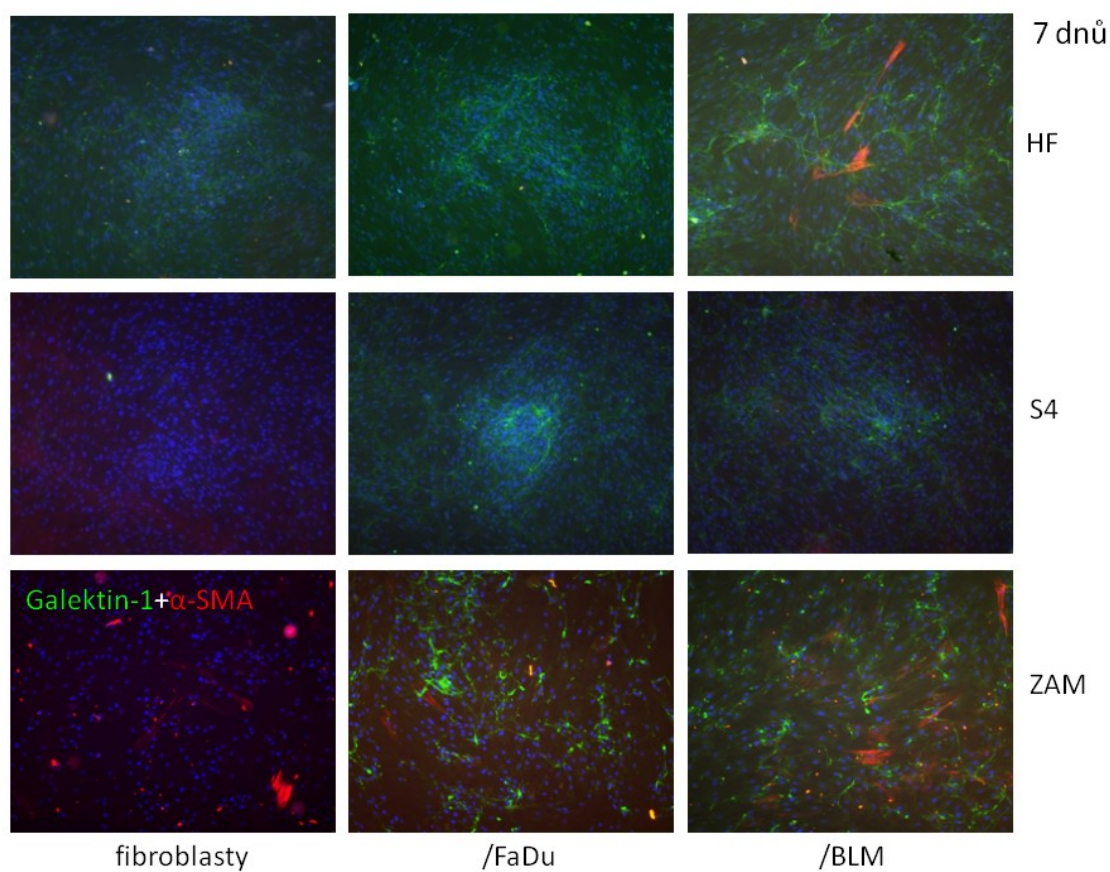


Obr. 10: 7denní kultivace – porovnání produkce fibronektinu (zeleně) a tenascin (červeně) u tří druhů fibroblastů (HF, MAM, ZAM) kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM).

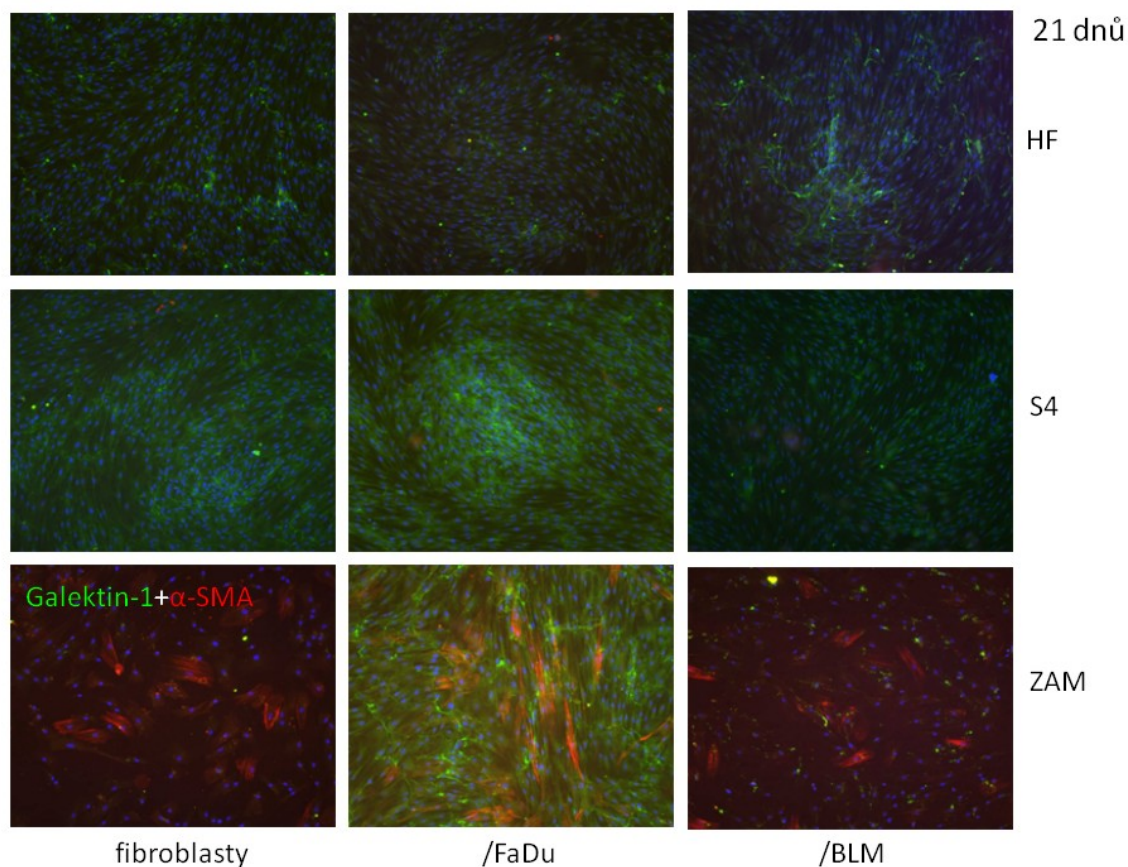


Obr. 11: : 21denní kultivace – porovnání produkce fibronektinu (zeleně) a tenascin (červeně) u tří druhů fibroblastů (HF, MAM, ZAM) kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM).

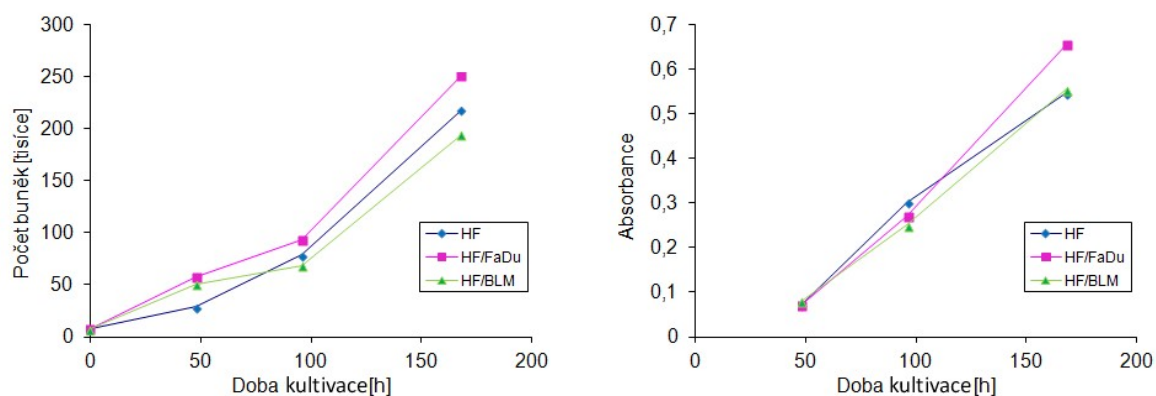




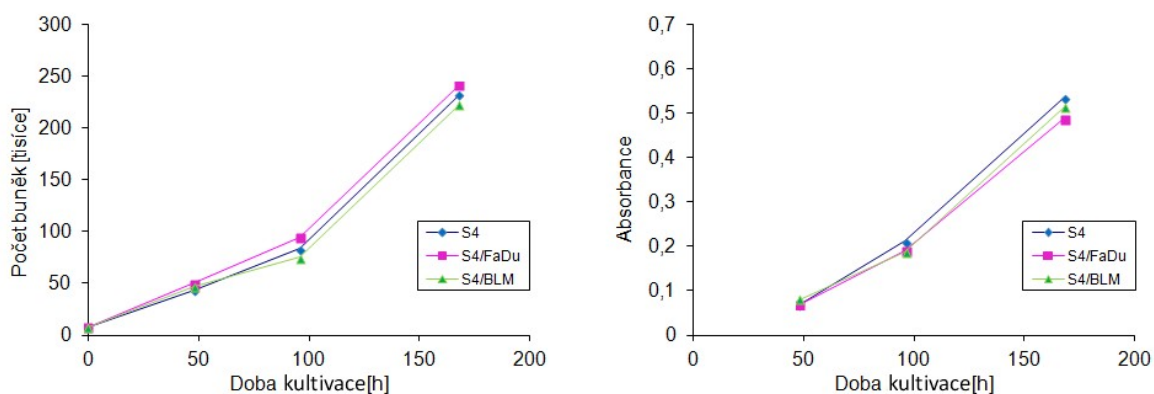
Obr. 12: 7denní kultivace – porovnání produkce galektinu-1 (zeleně) a exprese  $\alpha$ -SMA (červeně) u tří druhů fibroblastů (HF, MAM, ZAM) kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM).



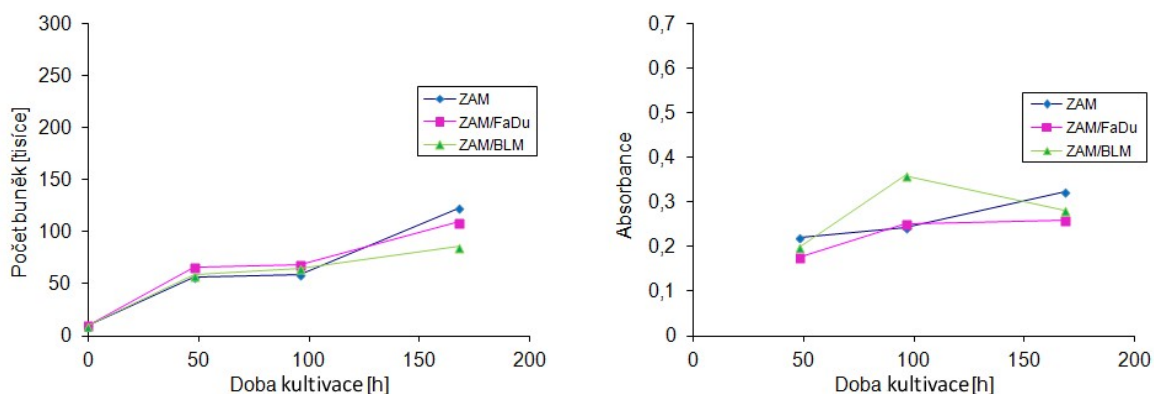
Obr. 13: 21denní kultivace – porovnání produkce galektinu-1 (zeleně) a exprese  $\alpha$ -SMA (červeně) u tří druhů fibroblastů (HF, MAM, ZAM) kultivovaných samotných a pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM).



Obr. 14: Porovnání růstu zdravých dermálních fibroblastů (HF) – samotných, pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM). Vlevo růstová křivka sestavena pomocí počítání buněk, vpravo pomocí MTT testu.



Obr. 15: Porovnání růstu stromálních fibroblastů ze spinocelulárního karcinomu (S4) – samotných, pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM). Vlevo růstová křivka sestavena pomocí počítání buněk, vpravo pomocí MTT testu.



Obr. 16: Porovnání růstu stromálních fibroblastů melanomu (ZAM) – samotných, pod vlivem nádorových keratinocytů (FaDu) a melanocytů (BLM). Vlevo růstová křivka sestavena pomocí počítání buněk, vpravo pomocí MTT testu.

#### 4.3. SLEDOVÁNÍ RŮSTOVÉHO POTENCIÁLU, TVORBY EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A PŘECHODU V MYOFIBROBLASTY RŮZNÝCH STROMÁLNÍCH FIBROBLASTŮ Z MELANOMU- INDUKCE VLIVEM KONDICIOVANÝCH MÉDIÍ ZE ZDRAVÝCH A NÁDOROVÝCH MELANOCYTŮ

V pokusu byly použity dva typy stromálních fibroblastů z melanomu MAM, ZAM a zdravé dermální fibroblasty HF. Tyto fibroblasty byly kultivovány v kondiciovaných médiích ze čtyř typů buněk – nádorových melanocytů (Asc, BLM, G361) a vysoce pigmentovaných neonatálních melanocytů (MelHP). Jako kontrolní médium bylo použito DMEM. Byla sledována produkce extracelulární matrix (fibronektin, galektin-1), přítomnost aktivovaných

myofibroblastů ( $\alpha$ -SMA) a také růstový potenciál (Nestin, Ki-67) ve dvou časových intervalech 11 a 21 dní.

Po 11 dnech kultivace vykazovaly všechny tři typy fibroblastů ve všech kultivačních médiích alespoň slabou produkci fibronektinu (Obr. 17, 18, 19). Zdravé dermální fibroblasty v DMEM i v KM MelHP produkovaly stejné množství fibronektinu, který vytvářel síť. Při použití KM z nádorových melanocytů došlo v tomto časovém intervalu ke zvýšení produkce fibronektinových sítí, nejvýraznější nárůst byl v případě KM Asc. U stromálních fibroblastů MAM byla produkce fibronektinu srovnatelná s produkcí u HF. Rozdílný však byl vliv jednotlivých médií. U těchto buněk nejvíce stimulovalo expresi fibronektinu kondicionované médium z MelHP, zatímco KM Asc ji inhibovalo. Kondicionovaná média z BLM a G361 ji ve srovnání s kontrolním DMEM výrazným způsobem neovlivnila. V případě stromálních fibroblastů ZAM byla produkce fibronektinu velmi chudá. V kontrolním DMEM produkovaly ZAM fibronektinové sítě pouze lokálně. Ke zvýšení exprese fibronektinu a tvorbě sítí došlo pod vlivem KM Asc, ve všech ostatních případech byla produkce fibronektinu nízká a pouze ojedinělá, rozsáhlejší sítě nebyly vytvořeny.

Po 21 dnech kultivace zůstala produkce fibronektinu dermálními fibroblasty srovnatelná s produkcí po 11denní kultivaci (Obr. 17, 18, 19). Vytvořené sítě byly jemnější a rovnoměrné. Pouze v případě KM BLM došlo k výraznému snížení exprese fibronektinu. Naproti tomu vysoká exprese fibronektinu přetrvávala v případě kultivace v KM Asc. U MAM došlo k výraznému poklesu produkce fibronektinu ve všech typech médií. Extracelulární sítě byly tvořeny pouze lokálně, k největšímu snížení produkce fibronektinu došlo v případě KM Asc, kde se fibronektin vyskytoval zejména intracelulárně. V KM BLM a KM G361 se tvořily sítě velmi omezeně. I u druhých stromálních fibroblastů ZAM došlo po 21 dnech k výraznému poklesu exprese fibronektinu. Extracelulární sítě byly vytvořeny pouze v DMEM, kde oproti intervalu 11 dnů došlo k nárůstu množství produkovaného fibronektinu a zvýšila se jeho homogenita. V KM MelHP byla velmi slabá extracelulární produkce fibronektinu, v KM z nádorových melanocytů se jeho produkce přesunula zejména do buněk a extracelulárně se objevovala pouze výjimečně. Vimentin jako znak mezenchymálních buněk byl exprimován ve všech buňkách po celou dobu experimentu a byl použit zejména pro zviditelnění jejich morfologie.

V časovém intervalu 11 dní produkovaly HF galektin-1 ve všech případech (Obr. 20). Nejjemnější sítě byly tvořeny v kontrolním DMEM, ve všech ostatních médiích byla exprese galektinu-1 vyšší. Po 21 dnech dermální fibroblasty v DMEM a v KM Asc svou expresi ještě zvýšily, zatímco v KM MelHP a v KM G361 produkce galektinu-1 zcela vymizela. HF kultivované v KM BLM exprimovaly po 21 dnech galektin-1 pouze intracelulárně.

U stromálních fibroblastů MAM byla exprese galektinu-1 po 11 dnech velmi nízká (Obr. 21). Slabá produkce byla zachycena v DMEM, KM Asc, a KM G361. V KM MelHP a KM BLM nebyl galektin-1 vůbec detekován. Exprese galektinu-1 v buňkách kultivovaných 21 dnů se výrazně změnila. Zatímco v DMEM zůstala na stejné úrovni jako po 11 dnech, u KM Asc a KM G361 byl galektin-1 exprimován pouze intracelulárně. V KM MelHP a KM BLM, kde byly fibroblasty v krátkodobé kultivaci galektin-1 negativní, začaly buňky MAM produkovat a vytvářet celoplošné sítě, jejichž intenzita byla srovnatelná s expresí galektinu-1 v DMEM.

Úroveň exprese galektinu-1 buňkami ZAM byla po 11 dnech srovnatelná s produkcí tohoto proteinu u MAM (Obr. 22). ZAM produkovaly galektin-1 v DMEM a KM MelHP. V KM BLM byla detekována slabá produkce galektinu-1 intracelulárně a v KM Asc a KM G361 nebyla exprese galektinu-1 zjištěna vůbec. Po 21 dnech se exprese galektinu-1 oproti 11denní kultivaci prakticky nezměnila, v DMEM a v KM MelHP buňky i nadále tvořily sítě, v KM BLM byl galektin-1 exprimován opět intracelulárně a v KM Asc a KM G361 nebyl detekován vůbec.

Tvorba myofibroblastů byla sledována pomocí exprese  $\alpha$ -SMA. V HF (Obr. 20) se po 11 dnech překvapivě objevovala přítomnost myofibroblastů (pozitivita  $\alpha$ -SMA), která byla ve všech médiích s výjimkou kultivace v KM BLM. HF se ojediněle měnily v myofibroblasty jak v kontrolním DMEM, tak i ve většině kondiciovaných médií – KM Asc, KM G361 a zejména v KM MelHP. V KM BLM byla exprese  $\alpha$ -SMA dermálními fibroblasty zcela výjimečná (jediný vznikající myofibroblast zachycený na obrázku). MAM (Obr. 21) myofibroblasty téměř netvořily, slabou pozitivitu u nich dokázalo vyvolat pouze KM Asc a KM MelHP. ZAM (Obr. 22) tvořily v DMEM velké množství myofibroblastů. Tuto schopnost měly též v KM MelHP a KM G361. V KM Asc se objevovaly první náznaky  $\alpha$ -SMA v některých buňkách, zatímco v KM BLM začínaly ZAM již ojediněle tvořit myofibroblasty.

Exprese  $\alpha$ -SMA v 21denní kultivaci spíše ubývala. Myofibroblasty v kultuře HF (Obr. 20) se objevily zejména v KM MelHP a slabě také v KM Asc. Při kultivaci HF v DMEM a v KM G361

došlo k téměř úplnému vymizení exprese  $\alpha$ -SMA a v KM BLM zůstala exprese nadále negativní. MAM v dlouhodobé kultivaci (Obr. 21) myofibroblasty netvořily téměř vůbec, velmi slabou expresi  $\alpha$ -SMA si uchovaly pouze v kondiciovaném médiu z MelHP. Také u ZAM (Obr. 22) došlo k mírnému poklesu exprese  $\alpha$ -SMA po 21 dnech. Nejvíce myofibroblastů bylo vytvořeno v DMEM a v kondiciovaném médiu z BLM méně v KM MelHP a KM G361. V KM Asc zůstaly ZAM i nadále pro tento znak negativní.

Jako znak zralosti buněk byla sledována exprese nestinu. Po 11 dnech kultivace exprimovaly dermální fibroblasty nestin silně v DMEM i v KM BLM a v KM G361. V KM Asc produkovaly buňky nestin jen ostrůvkovitě a byly též ve srovnání s ostatními médii méně rozprostřené, v KM MelHP byly zcela negativní (Obr. 23). Po 21 dnech zůstala u HF zachována produkce nestinu v DMEM, KM BLM i KM G361. V KM Asc vymizela jeho exprese úplně, naproti tomu se nově objevila v KM Mel HP. Ve srovnání s HF exprimovaly stromální fibroblasty MAM nestin jen velmi omezeně (Obr. 24). MAM byly nestin negativní v DMEM, ale v kondiciovaných médiích začaly nestin exprimovat. V KM MelHP a KM G361 byla jeho exprese vyšší, v KM BLM nižší a v KM Asc jen velmi slabá. Po 21 dnech zůstala zachována produkce nestinu v KM MelHP a nově se objevila v DMEM. Naproti tomu v kondiciovaných médiích z nádorových melanocytů téměř vymizela. Stromální fibroblasty ZAM exprimovaly nestin ve všech médiích i v obou časových intervalech (Obr. 25). Pouze v kondiciovaném médiu z Asc byla jeho pozitivita po 11 dnech velmi slabá, avšak po 21 dnech již byla srovnatelná s expresí v ostatních kultivačních médiích.

Ki-67 po 11 dnech kultivace bylo pozitivní ve všech typech fibroblastů kultivovaných v DMEM (Obr. 23, 24, 25). HF si pozitivitu tohoto znaku zachovaly ve všech kondiciovaných médiích, pouze v KM BLM byla pozitivita slabší. MAM exprimovaly Ki-67 ve všech médiích bez velkých výkyvů v intenzitě. U ZAM se exprese pro Ki-67 v kondiciovaných médiích snižovala. Slabý pozitivní signál byl zachycen u KM MelHP, KM Asc a KM BLM a téměř úplná ztráta exprese Ki-67 byla pozorována při kultivaci v KM G361. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 13.

Expresí Ki-67 po 21 dnech kultivace byla opět pozitivní ve všech typech fibroblastů kultivovaných v DMEM. U HF pozitivita zůstala při kultivaci v KM MelHP, KM BLM a KM G361, ale vymizela v KM Asc. MAM byly pozitivní ve všech kultivovaných médiích, intenzita se ale oproti 11denní kultivaci mírně snížila. ZAM po 21 dnech exprimovaly Ki-67 v DMEM, méně v

KM Asc, v KM BLM a v KM MelHP. Exprese Ki-67 v KM G361 se nezvýšila. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 14.

Tab. 13: 11denní kultivace – porovnání produkce extracelulární matrix (fibronectin, galektin-1), přítomnosti aktivovaných myofibroblastů (galektin-1,  $\alpha$ -SMA) a růstového potenciálu (Nestin, Ki-67) u stromálních fibroblastů z melanomu a zdravých dermálních fibroblastů při kultivaci v kondiciovaných médiích tří druhů melanomových buněk a vysoce pigmentovaných neonatálních melanocytů. Jako kontrolní médium bylo použito DMEM.

11 dní	Fibronectin	Vimentin	Galektin-1	$\alpha$ -SMA	Nestin	Ki-67
HF (DMEM)	+	+	+/-	+	+	+
HF (MelHP)	+	+	+	+	-	+
HF (Asc)	+	+	+	+	+	+
HF (BLM)	+	+	+/-	-	+	+/-
HF (G361)	+	+	+/-	+	+	+
MAM (DMEM)	+	+	+/-	-	-	+
MAM (MelHP)	+	+	-	-	+	+
MAM (Asc)	+	+	+/-	+/-	+/-	+
MAM (BLM)	+	+	-	-	+/-	+
MAM (G361)	+	+	+/-	-	+	+
ZAM (DMEM)	+	+	+	+	+	+
ZAM (MelHP)	+/-	+	+	+	+	+/-
ZAM (Asc)	+	+	-	-	+/-	+/-
ZAM (BLM)	+	+	+/- IC	+/-	+	+/-
ZAM (G361)	+	+	-	+	+	-

IC (znak se vyskytuje intracelulárně); + (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); - (negativní znak)

Tab. 14: 21denní kultivace – porovnání produkce extracelulární matrix (fibronectin, galektin-1), přítomnosti aktivovaných myofibroblastů (galektin-1,  $\alpha$ -SMA) a růstového potenciálu (Nestin, Ki-67) u stromálních fibroblastů z melanomu a zdravých dermálních fibroblastů při kultivaci v kondiciovaných médiích tří druhů melanomových buněk a vysoce pigmentovaných neonatálních melanocytů. Jako kontrolní médium bylo použito DMEM.

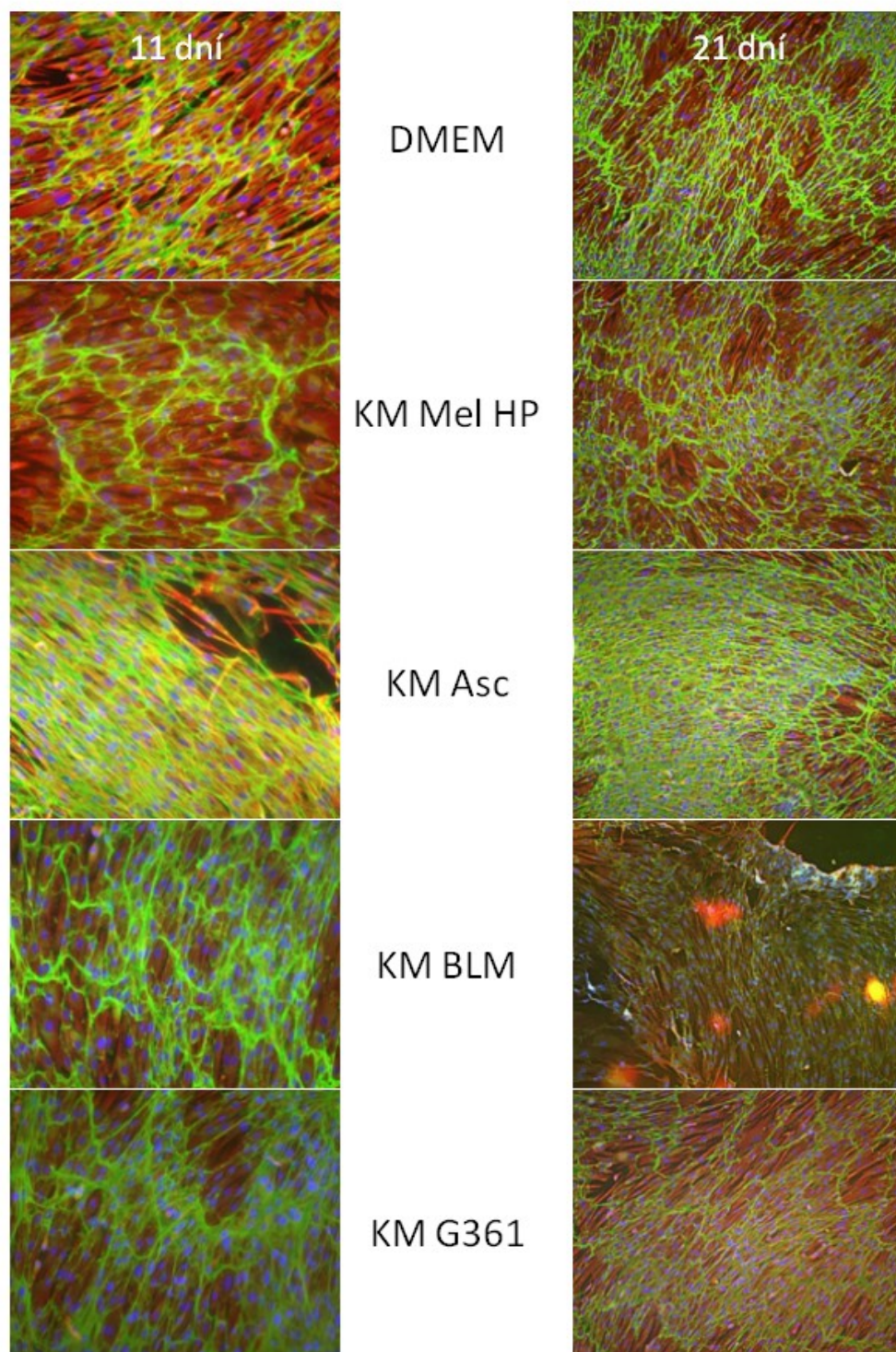
21 dní	Fibronectin	Vimentin	Galektin-1	$\alpha$ -SMA	Nestin	Ki-67
HF (DMEM)	+	+	+	-	+	+
HF (MelHP)	+	+	-	+	+	+
HF (Asc)	+	+	+	+/-	-	-
HF (BLM)	+/-	+	+/- IC	-	+	+
HF (G361)	+	+	-	-	+	+

MAM (DMEM)	+	+	+	–	+	+
MAM (MeIHP)	+	+	+	–	+	+
MAM (Asc)	+/- IC	+	+/- IC	–	+/-	+/-
MAM (BLM)	+	+	+/-	–	+/-	+/-
MAM (G361)	+/- IC	+	+/- IC	–	+/-	+/-
ZAM (DMEM)	+	+	+	+	+	+
ZAM (MeIHP)	–	+	+	+	+	–
ZAM (Asc)	+ IC	+	–	–	+	+/-
ZAM (BLM)	+/- IC	+	+/- IC	+	+	+/-
ZAM (G361)	+/-IC	+	–	+/-	+	–

IC (znak se vyskytuje intracelulárně); + (jasně pozitivní znak); +/- (ojediněle pozitivní znak); – (negativní znak)

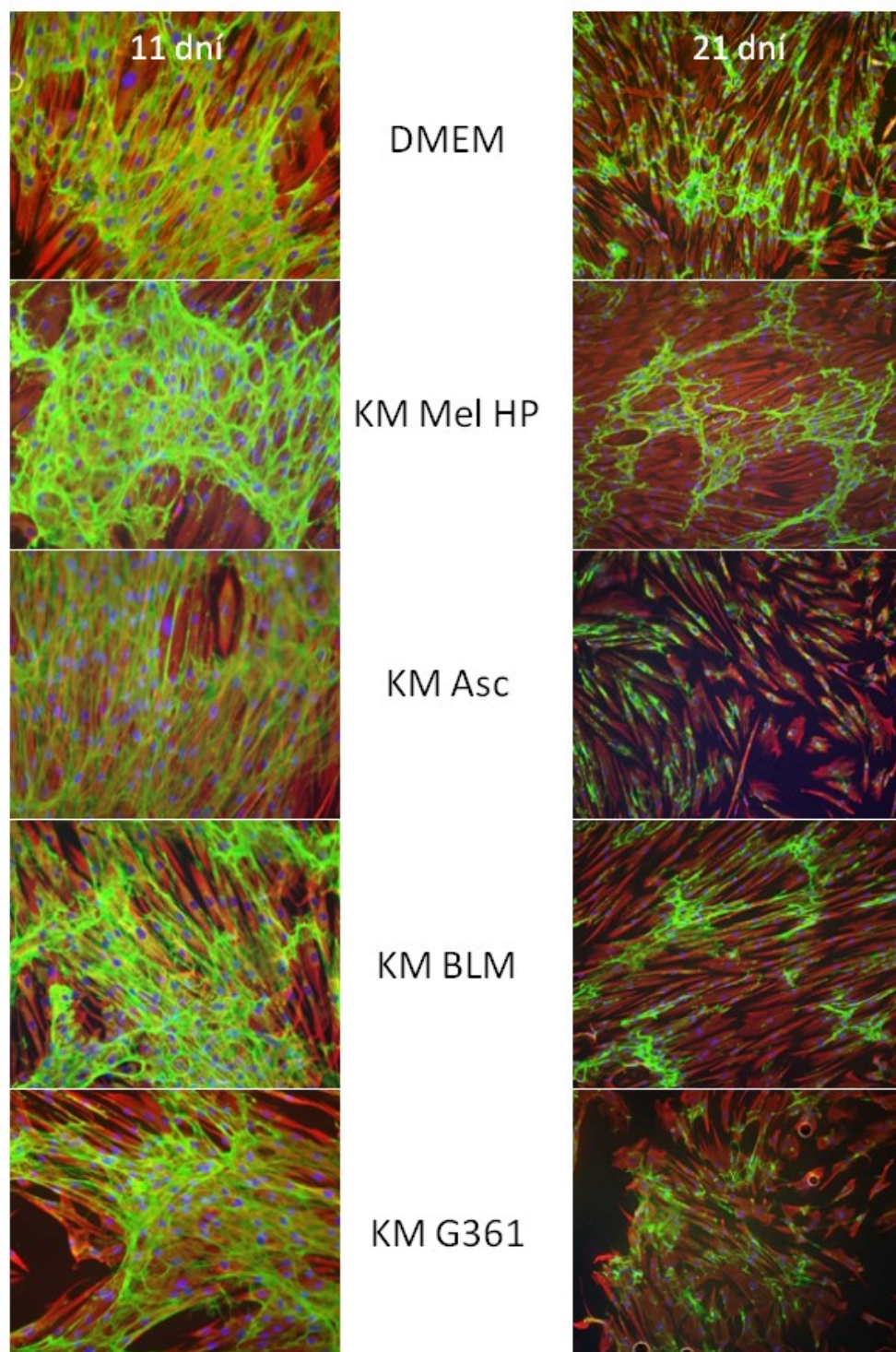


HF v kondiciovaných médiích: **Fibronectin** + **Vimentin**



Obr. 17: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce fibronektinu (zeleně) a exprese vimentinu (červeně) u zdravých dermálních fibroblastů (HF) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

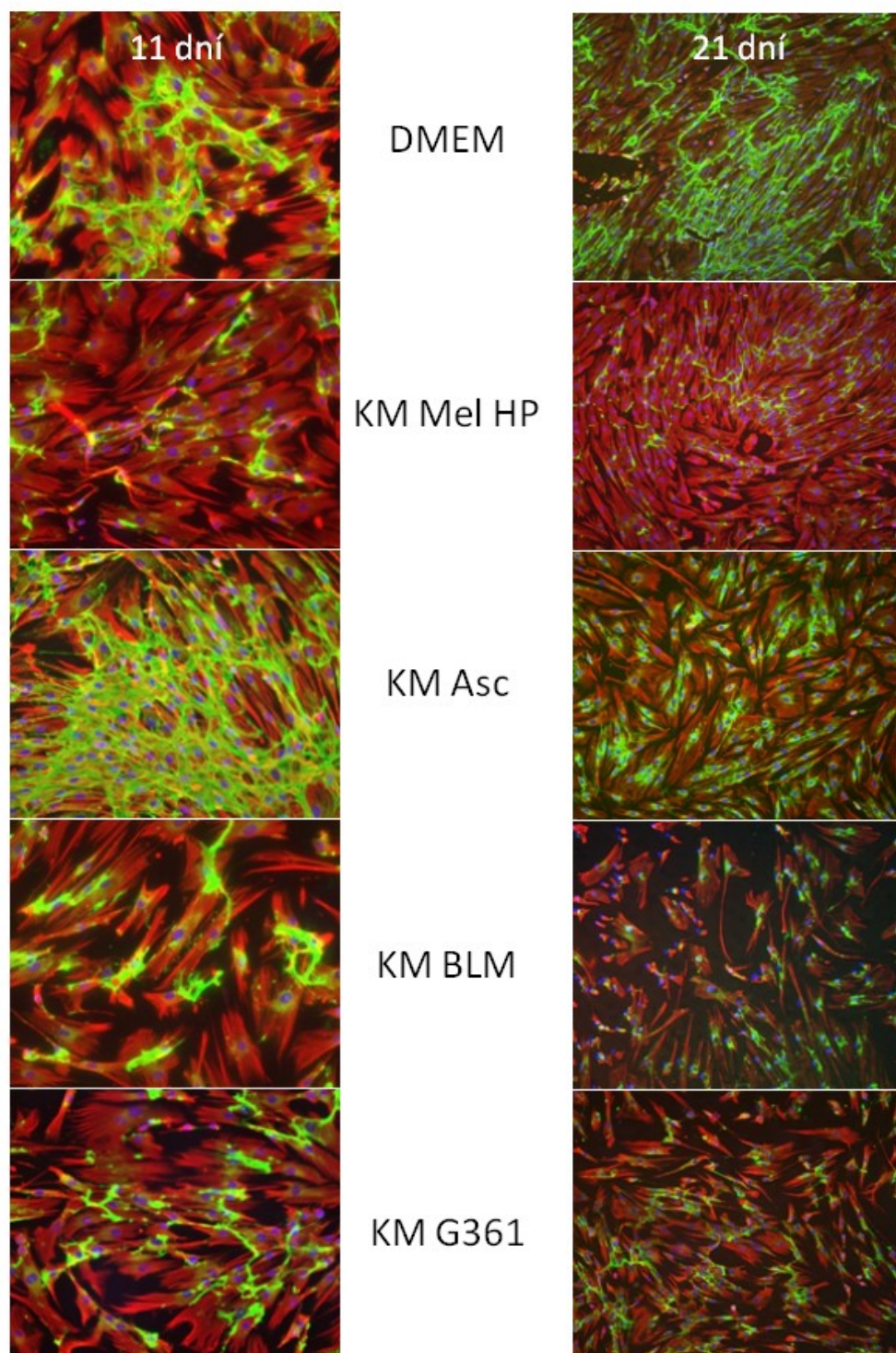
MAM v kondiciovaných médiích: **Fibronectin** + **Vimentin**



Obr. 18: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce fibronektinu (zeleně) a exprese vimentinu (červeně) u stromálních fibroblastů z melanomu (MAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

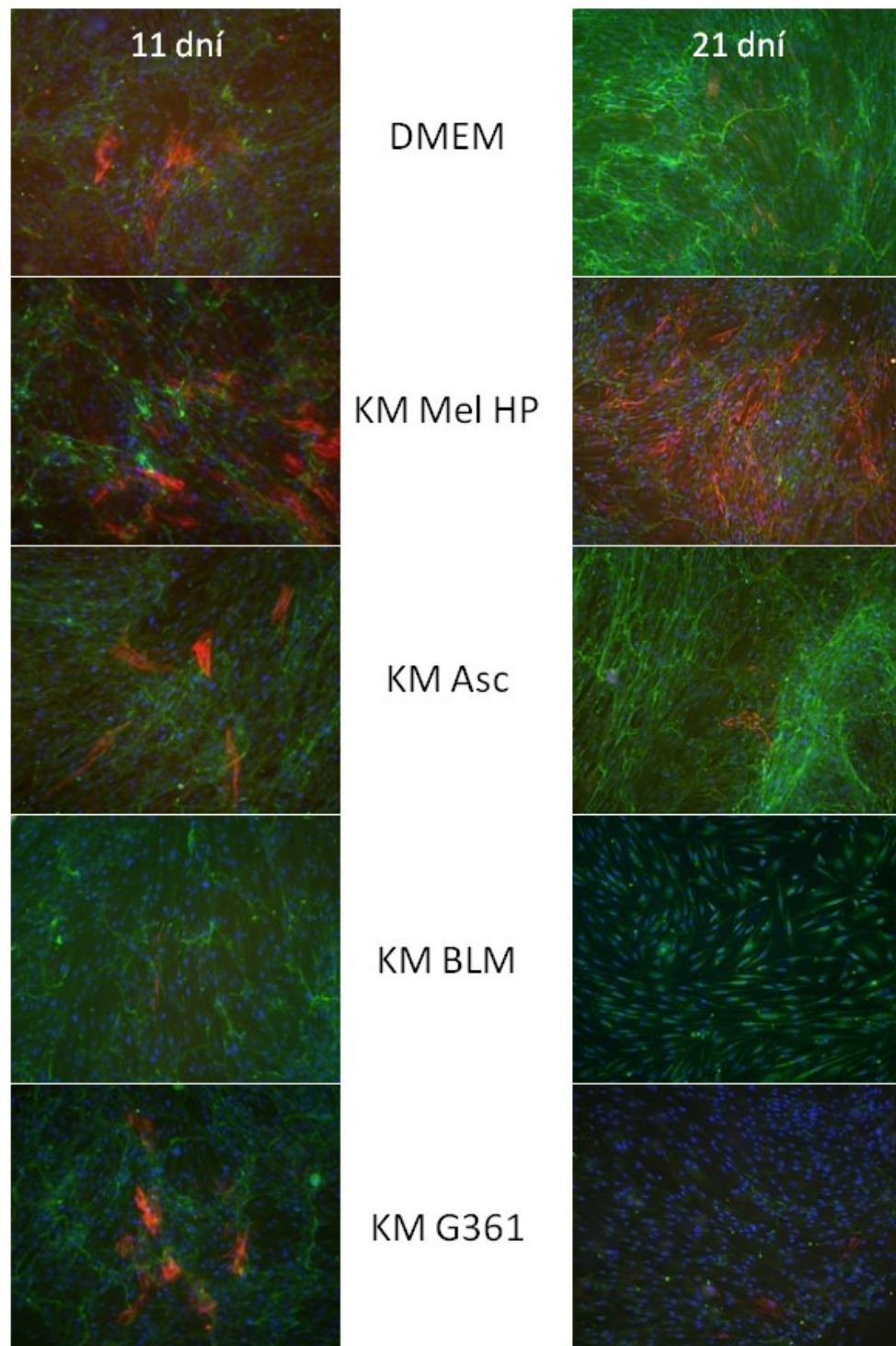


ZAM v kondiciovaných médiách: **Fibronektin** + **Vimentin**



Obr. 19: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce fibronektinu (zeleně) a exprese vimentinu (červeně) u stromálních fibroblastů z melanomu (ZAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

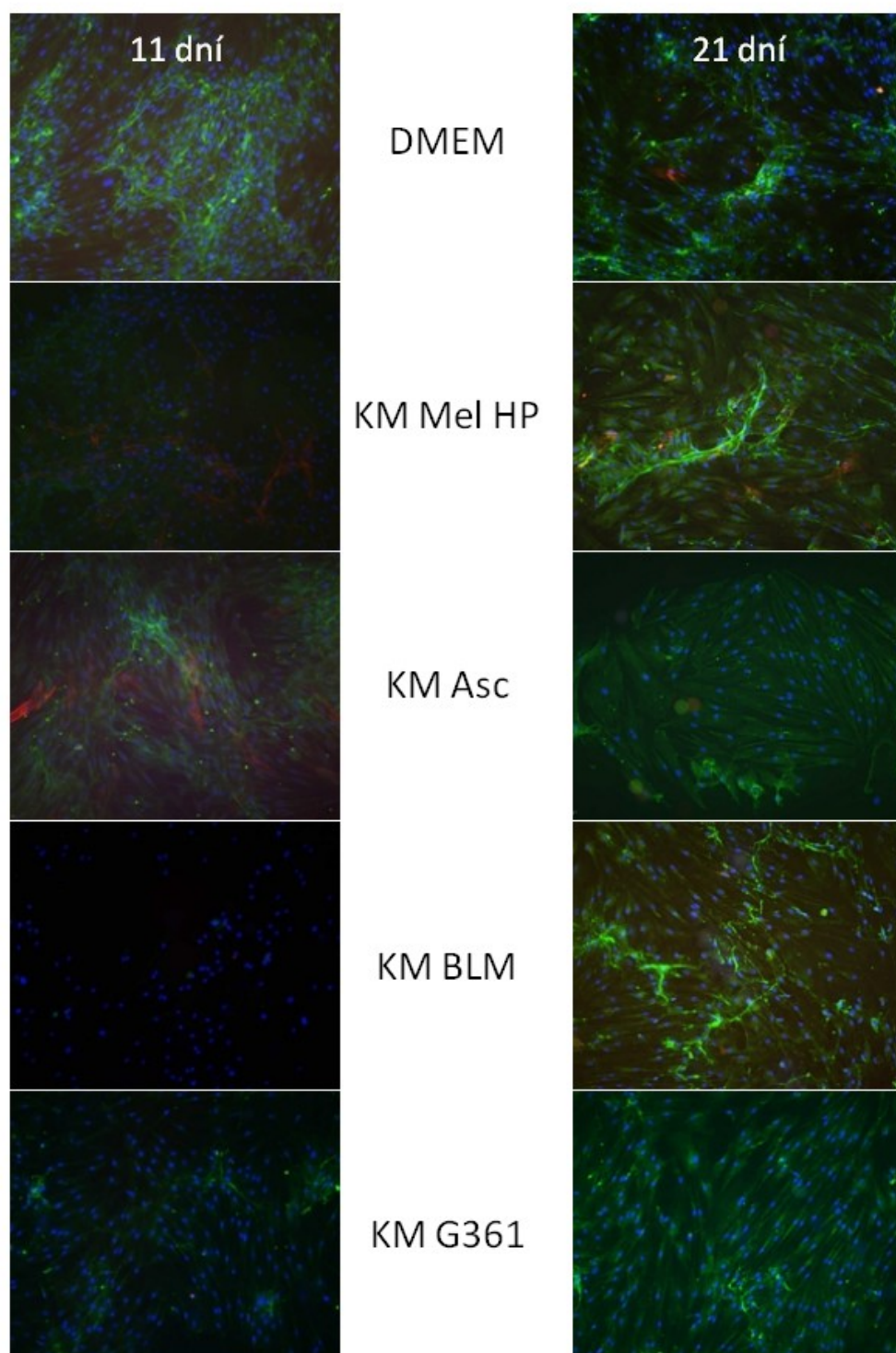
HF v kondiciovaných médiích: **Galektin-1** +  **$\alpha$ -SMA**



Obr. 20: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce galektinu-1 (zeleně) a exprese  $\alpha$ -SMA (červeně) u zdravých dermálních fibroblastů (HF) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

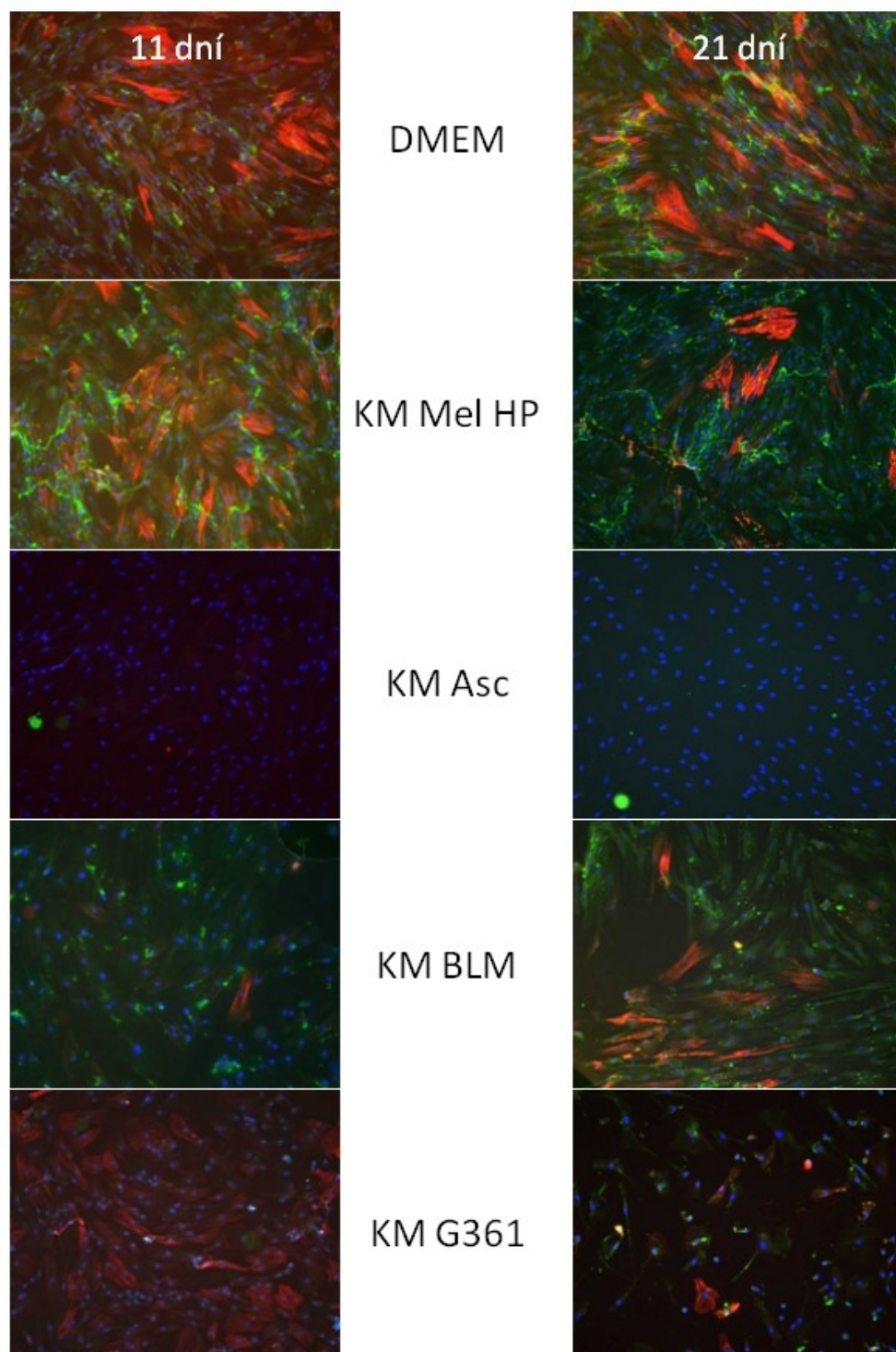


MAM v kondiciovaných médiích: **Galektin-1** +  **$\alpha$ -SMA**



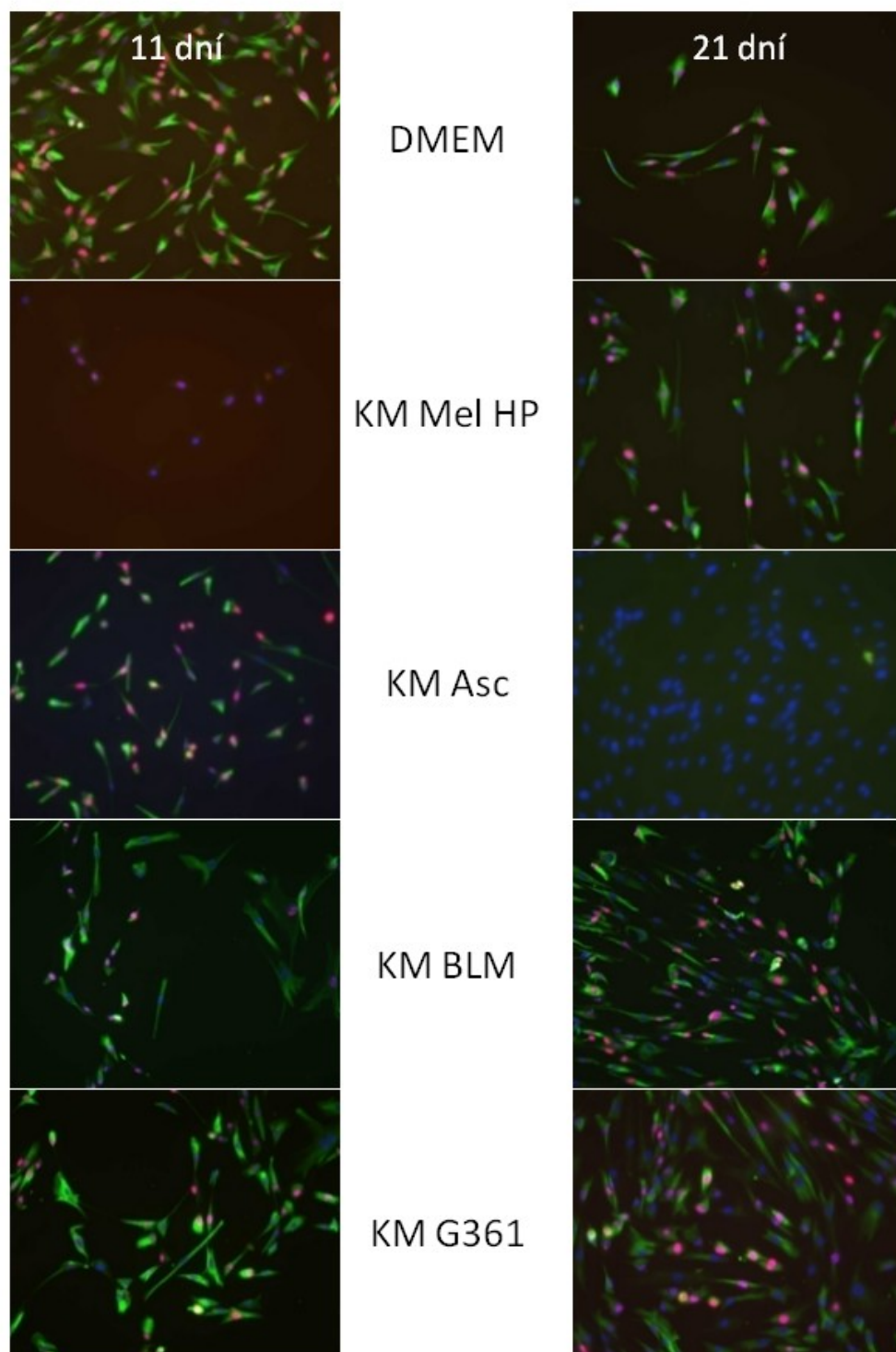
Obr. 21: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce galektinu-1 (zeleně) a exprese  $\alpha$ -SMA (červeně) stromálních fibroblastů z melanomu (MAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

ZAM v kondiciovaných médiích: **Galektin-1** +  **$\alpha$ -SMA**



Obr. 22: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání produkce galektinu-1 (zeleně) a exprese  $\alpha$ -SMA (červeně) u stromálních fibroblastů z melanomu (ZAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

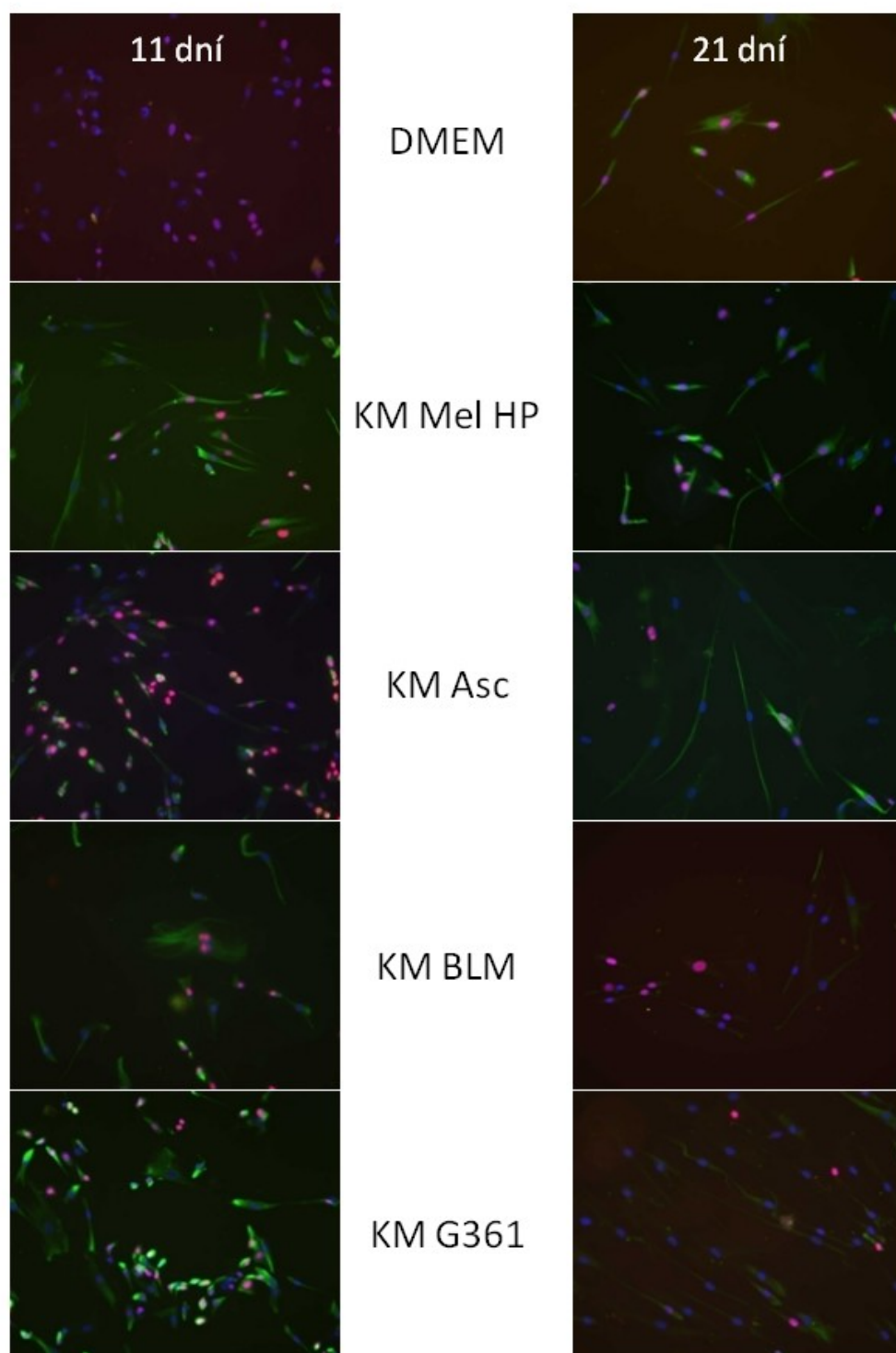
## HF v kondiciovaných médiích: Nestin + Ki67



Obr. 23: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání exprese nestinu (zeleně) a Ki-67 (červeně) u zdravých dermálních fibroblastů (HF) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.



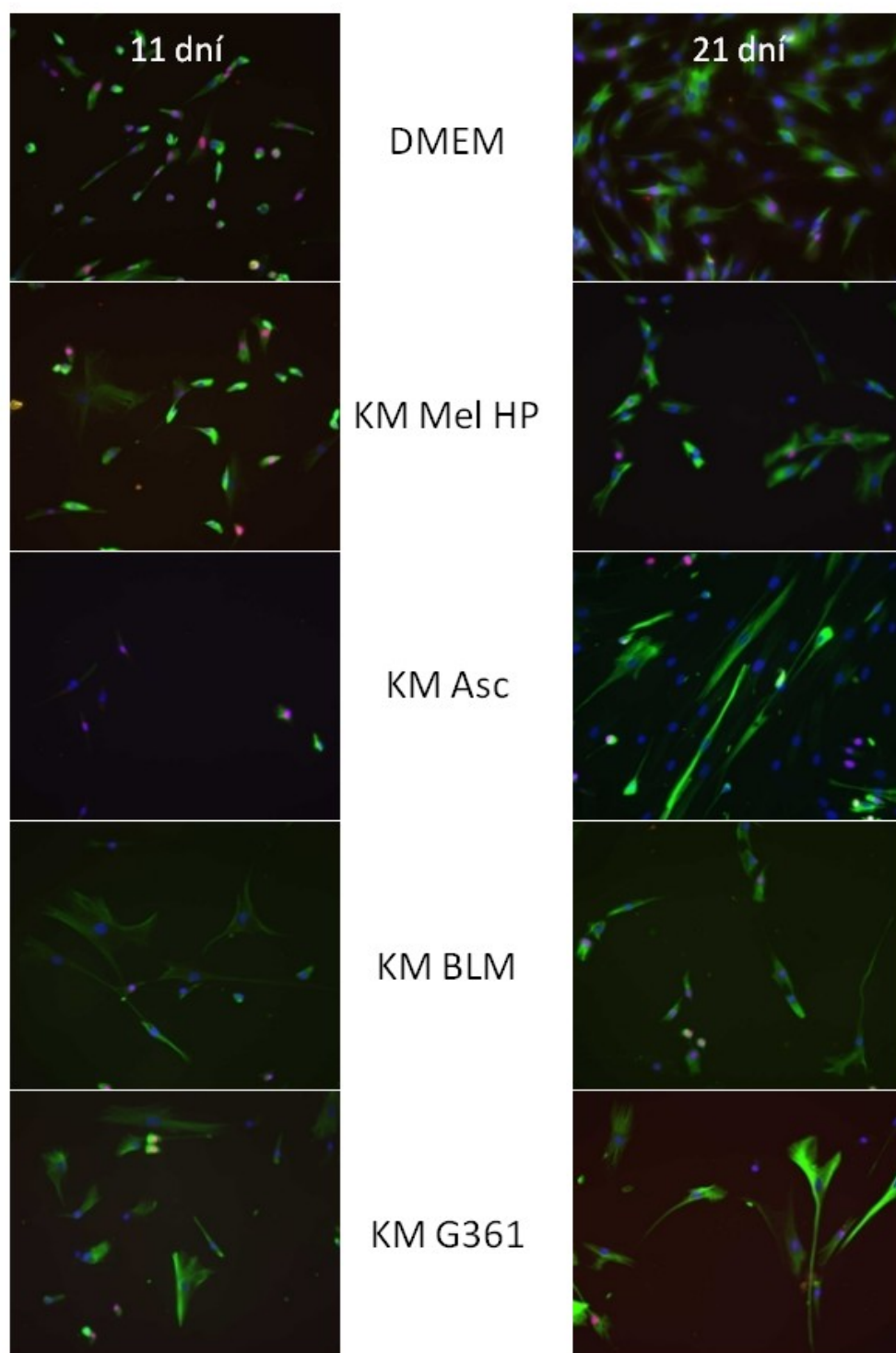
MAM v kondiciovaných médiách: Nestin + Ki67



Obr. 24: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání exprese nestinu (zeleně) a Ki-67 (červeně) u stromálních fibroblastů z melanomu (MAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.



ZAM v kondiciovaných médiích: Nestin + Ki67



Obr. 23: Kultivace 11 a 21 dní – porovnání exprese nestinu (zeleně) a Ki-67 (červeně) u stromálních fibroblastů z melanomu (ZAM) v DMEM a různých kondiciovaných médiích.

## 5. DISKUZE

### 5.1. INDUKCE KMENOVÝCH ZNAKŮ U MELANOMOVÝCH LINIÍ

V předchozích pokusech provedených v naší laboratoři se podařilo prokázat vliv stromálních fibroblastů na diferenciaci nádorových melanocytů podobný jako při použití média s faktory sekretovanými lidskými embryonálními buňkami (Kodet et al., 2013). Existují také práce ukazující na velký význam neadhezivního prostředí spolu s kultivačním médiem pro buňky neurální lišty, tedy pro progenitorové buňky melanocytů (Ramgolam et al., 2011).

V tomto experimentu vycházejícím v základech z obou předchozích bylo cílem náš *in vitro* kultivační model přiblížit co nejvíce podmínkám *in vivo*. K simulaci nádorového mikroprostředí byly použity stromální fibroblasty a jejich vliv na nádorové melanocyty. Buňky byly také vystaveny neadhezivnímu prostředí, které simulovalo prostředí v průběhu metastazování melanomu.

Nádorové melanocyty BLM byly izolovány z klinicky vysoce agresivního nádoru s rychlým postupem metastáz. V *in vitro* podmínkách se jednalo o linii s nejproměnlivějším fenotypem ze všech námi používaných linií melanocytů.

Nestin je protein intermediálních filament, který byl poprvé identifikován v cytoplazmě neuroepitelových kmenových buněk. Účastní se vývoje organismu především v nervovém systému. Jeho výskyt v melanocytech je považován za mírný stupeň dediferenciace buněk a může také naznačovat zvýšený růstový potenciál (Flørenes et al., 1994, Perego et al., 2010). BLM tento znak exprimovaly ve všech kultivačních podmínkách a slabá exprese nestinu je u nich výchozí stav. Kokultivace s CAFs však expresi nestinu výrazně posílila. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími pozorování v naší laboratoři (Kodet et al., 2013). Expresi nestinu může značit do určité míry právě dediferenciaci buněk. Dále bylo zjištěno, že exprese nestinu je vyšší v metastázách melanomu než v primárních nádorech, v tomto smyslu může značit vyšší metastatický potenciál (Flørenes et al., 1994).

Oct4 i Nanog jsou znaky pokročilé dediferenciace a kmenovosti často používané u nádorových buněk. Patří mezi čtyři základní proteiny, jejichž exprese je charakteristická pro embryonální kmenovou buňku (Ramgolam et al., 2011). U nádorových melanocytů kultivovaných v médiu pro buňky neurální lišty a rostoucích v neadhezivním prostředí se zvyšovala exprese Oct4 a Nanog, což naznačovalo zvýšený invazivní a metastatický potenciál.

Zvýšená exprese těchto znaků je také spojena s horší prognózou a vyšší pravděpodobností metastazování *in vivo* (Borrull et al., 2012). V tomto pokusu byla u BLM pozorována pozitivita těchto dvou znaků pouze v takových kultivačních podmínkách, kde byly nádorové melanocyty v přímém kontaktu s CAFs a zároveň byly přeneseny do neadhezivního prostředí. Neadhezivní prostředí simulující prostředí metastazování nádoru tedy u této agresivní linie bylo schopno vyvolat dediferenciaci a kmenový charakter buněk. Indukce exprese Oct4 a Nanog v neadhezivním prostředí lze hodnotit jako velmi významnou změnu fenotypu, která se shoduje s předchozími pozorováními u buněk kultivovaných v médiu pro buňky neurální lišty (Ramgolam et al., 2011).

Výskyt exprese keratinů v melanocytech může být znakem určité pleomorfie, ale se současnou expresí vimentinu i toho, že buňka se nachází v EMT. Koexprese vimentinu a keratinů v nádorových melanocytech jsou spojovány se zvýšenou schopností buněk invadovat přes bazální membránu a metastazovat do okolí (Hendrix et al., 1991). Interpretace výskytu exprese keratinu v melanocytech však není zcela jednoznačná. U BLM byla exprese keratinů vyvolána pravděpodobně přímým kontaktem melanocytů s CAFs, při přerůstání CAFs nádorovými buňkami a přenesení do neadhezivního prostředí nezůstal tento znak zachován.

CD271, marker buněk neurální lišty a tedy dediferenciace melanocytů považovaný také za možný znak nádorových kmenových buněk (Boiko et al., 2010), zůstal ve všech případech negativní, stejně tak Sox2, další z proteinů charakterizujících pluripotentní embryonální buňku (Girouard et al., 2012). Markery typické pro melanocyty (S100, HMB-45; Carlson et al., 2005) byly také při všech kultivačních podmínkách negativní. V případě markeru S100 je bohužel nejvíce pravděpodobné, že příčinou negativity byla nefunkčnost použité protilátky, protože buňky se zjevným předpokladem positivity byly opakovaně negativní i při použití více barvicích technik. V případě HMB-45 bylo v naší laboratoři dříve pozorováno, že melanocyty tento znak skutečně v *in vitro* kultivaci ztrácejí, ovšem určité podněty (CAFy, CEE, médium pro hESC) dokázaly expresi tohoto znaku v melanocytech na určitou dobu opět vyvolat (Kodet et al., 2013). Vysvětlením pro negativitu HMB-45 bez výjimky může být zachycení buněk až po fázi dočasné positivity znaků, vyvolané kultivačními podmínkami.

Kontrolní experiment, ve kterém byly CAFs nahrazeny zdravými dermálními fibroblasty, dokázal, že ke změně svého fenotypu potřebují nádorové buňky právě vliv CAFs. Kontakt s HF nezměnil v BLM expresi žádných sledovaných znaků, ač se dá předpokládat, že takto kokultivované buňky spolu také určitým způsobem komunikují. Komunikace mezi nádorovými melanocyty a CAFs z melanomu je tedy natolik specifická, že vyúsťuje ve změny, kterých HF nejsou schopny dosáhnout.

Linie G361 pochází z kožní metastázy klinicky pomaleji postupujícího nádoru. V kontrolních buňkách byla pozorována exprese CD271, přímý kontakt melanocytů s CAFs způsobil zvýšení positivity, což ukazuje na to, že jejich přítomnost posouvá nádorové buňky k méně diferencovanému fenotypu. Při dlouhodobém kontaktu nádorových buněk se stromálními fibroblasty v adhezivním prostředí navíc došlo k expresi Oct4 a Nanog. Je zřejmé, že následné neadhezivní prostředí v případě této linie působilo jako nadměrný stresor, neboť buňky v něm expresi těchto znaků již nevykazovaly. Exprese všech dalších sledovaných markerů v buňkách G361 byla negativní.

Nádorové melanocyty Asc byly získány z nádorového ascitu pacienta s generalizovaným melanomem v klinickém stádiu IV s metastatickým postižením jater. Jednalo se tedy o zcela odlišné buňky než v předchozích případech. Nešlo o linii, ale o primárně izolované a pouze krátce kultivované a namnožené buňky. Vzhledem k tomu, že se jednalo o izolaci z ascitické tekutiny a buňky byly kultivovány pouze krátce, nelze vyloučit kontaminaci dalšími buněčnými typy. Buňky Asc byly specifické v tom, že i v základní kultivaci exprimovaly keratiny a v žádné z kultivačních podmínek je neztratily. Fenotyp těchto buněk byl velmi ustálený a prakticky se jej nepodařilo změnit. Tyto buňky byly již svým původem zvyklé na neadhezivní prostředí a na kontakt s různými druhy buněk vyskytujícími se v nádorovém ascitu. Změněné kultivační podmínky tedy pro ně na rozdíl od předchozích dvou linií neznamenal výrazný rozdíl oproti prostředí *in vivo*, s čímž pravděpodobně souvisí jejich ustálený fenotyp.

Některé buněčné linie tedy pod vlivem stromálních fibroblastů získávají znaky dediferenciace a kmenovosti, což ukazuje na jejich možnou plasticitu a vyšší metastatický potenciál v rámci nádoru i organismu. Schopnost dediferenciace nádorových buněk

v neadhezivním prostředí je zásadní pro zakládání metastáz a získané výsledky ukazují, že komplexní nádorové mikroprostředí zde může hrát klíčovou roli.

Linie nádorových melanocytů mezi sebou vykazují velké rozdíly v chování, morfologii a expresi sledovaných znaků. Důležitá je následná korelace výsledků *in vitro* kultivace s klinickými pozorováními, kde biologická agresivita nádoru odpovídala indukci exprese kmenových znaků v neadhezivním prostředí. Linie BLM pocházející z klinicky agresivního melanomu získala v neadhezivním prostředí znaky dediferenciace a kmenovosti. Toto prostředí pro ni bylo dostatečnou indukcí k dediferenciaci a zvýšení metastatického potenciálu. Naproti tomu u linie G361 pocházející z klinicky pomaleji progredujícího melanomu se neadhezivní prostředí ukázalo jako nadměrný stresor, ve kterém buňky naopak znaky dediferenciace ztrácely. Na linii Asc nemělo neadhezivní prostředí téměř žádný vliv, jelikož buňky byly z podobného prostředí přímo izolované. Studium chování nádorových buněk v adhezivním a neadhezivním prostředí tedy může přispět k objasnění mechanismů metastatického procesu a zdokonalit také experimentální techniky *in vitro* modelování.

## 5.2. SLEDOVÁNÍ MOŽNÉHO UNIFORMNÍHO CHOVÁNÍ CAFs Z RŮZNÝCH TYPŮ KOŽNÍCH NÁDORŮ

CAFs jsou důležitou součástí nádorového mikroprostředí, které komunikuje s buňkami nádoru a podporuje je v jejich progresi, ale i invazi a procesu metastazování (Cirri et Chiarugi, 2011; podrobně popsáno v kapitole 1.3.2.). Také v *in vitro* podmínkách dokážou CAFs působit na nádorové buňky a ovlivňovat jejich fenotyp směrem k získání kmenových atributů. Velmi zajímavý je fakt, že toto působení není specifické pro CAFs pocházející z příslušného nádoru, ale obdobný efekt na nádorové buňky mají i CAFs z nádorů odlišné histogeneze. V *in vitro* podmínkách dokážou CAFs ve zdravých keratinocytech vyvolat znaky typické pro nádorové, případně níže diferencované keratinocyty (Dvořánková et al., 2012). Je také již popsáno, že buněčná komunikace mezi nádorovými buňkami a CAFs není jednostranná, ale probíhá oběma směry, a nádorové buňky z tohoto důvodu mají podíl na fenotypu a fungování CAFs (Xing et al., 2010).

Tento experiment byl připraven takovým způsobem, aby ověřil, zda se chování CAFs mění jednotně či nikoliv, a to pod krátkodobým a dlouhodobým působením nádorových buněk z nádoru se stejným původem a z nádoru histogeneticky odlišného. Předmětem

zkoumání zároveň bylo, zda CAFs z rozdílných druhů nádorů reagují na jednotlivé nádorové buňky stejně, nebo jsou interakce specifické a rozdílné pro každý typ CAFs. Tyto interakce byly studovány pomocí několika rozdílných parametrů; byla sledována přeměna stromálních fibroblastů v myofibroblasty a produkce extracelulární matrix, rychlost proliferace a také metabolická aktivita buněk.

Fibronectin, velký multidoménový glykoprotein, je jednou ze základních součástí ECM a jeho exprese se zvyšuje například při remodelaci tkáně či při organogenezi, kde napomáhá vývoji cév. Ke zvýšené expresi dochází také při patologických stavech, jakým je například nádorové bujení, kde také přispívá k buněčné komunikaci vedoucí k novotvorbě cév (Van Obberghen-Schilling et al., 2011).

Tenascin je velký extracelulární protein, který má v normální tkáni nízké zastoupení. Zvýšený podíl tenascinu v ECM můžeme najít v embryonálních tkáních, ale i nádorech, kde jeho výskyt koreluje se špatnou prognózou. Tenascin moduluje buněčnou migraci, proliferaci a změnu signalizace v rámci nádoru (Midwood et al., 2009).

Výsledky experimentu ukázaly, že v produkci fibronektinu a tenascinu bylo působení různých nádorových buněk na jednotlivé fibroblasty jednotné. Pokud se zaměříme pouze na fibroblasty (zdravé dermální a stromální) ovlivněné nádorovými buňkami, můžeme konstatovat, že jejich produkce fibronektinu a tenascinu se v čase příliš neměnila. Rozdílné bylo pouze množství těchto proteinů produkované jednotlivými typy fibroblastů. V krátkodobém působení na HF nádorové buňky oproti tvorbě ECM samotnými dermálními fibroblasty produkci snižovaly. V dlouhodobé kultivaci došlo u samotných fibroblastů k útlumu tvorby ECM, zatímco tvorba ECM fibroblasty ovlivněnými nádorovými buňkami, zůstala stejná. Exprese fibronektinu a tenascinu zdravými fibroblasty přitom byla větší pod vlivem buněk FaDu než BLM. V případě stromálních fibroblastů S4 byla situace obdobná jako u HF, pouze s tím rozdílem, že samotné S4 produkci ECM s časem zvyšovaly. Samotné stromální fibroblasty z melanomu (ZAM) extracelulární matrix prakticky netvořily, a to ani v jednom z časových úseků. Pokud však byly ovlivněny nádorovými buňkami, došlo k výraznému nárůstu tvorby ECM, zejména v kratším časovém úseku. Při delším působení si ZAM pod vlivem FaDu svoji produkci udržely, ale pod vlivem BLM došlo k částečnému poklesu a fibronectin byl lokalizován zejména intracelulárně. V nádoru musí být rovnováha mezi četností a množstvím nádorových buněk a stromatu, kterého nemůže být příliš mnoho.

To je asi důvodem, proč v dlouhodobém působení S4 i ZAM v porovnání s krátkodobým působením zpomalí svou hojnou produkci ECM pod působením nádorových buněk, jelikož není žádoucí, aby stroma přerostlo a do jisté míry utlačilo buňky nádoru. Tento trend bylo možno pozorovat pouze u stromálních fibroblastů, u HF nebyl nalezen.

Ze sledovaných fibroblastů produkovaly stromální fibroblasty ze spinocelulárního karcinomu S4 nejvíce fibronektinu a tenascin. Spinocelulární karcinom je znám jako nádor bohatý na stroma (Ziobler et al., 2006), zatímco podle ústního sdělení MUDr. Ondřeje Kodeta (Dermatovenerologická klinika VFN, U Nemocnice 2, Praha 2; 10.6.2014) histologické analýzy naznačují, že melanom obsahuje daleko méně stromatu.

Galektin-1 je protein schopný vázat molekuly sacharidů a krom zapojení v běžných dějích ve tkáni se může účastnit i v nádorové progresi (Fred Brewer, 2002). Podílí se zde mimo jiné i na vzniku myofibroblastů a v kolokalizaci s expresí  $\alpha$ -SMA byla prokázána jeho souvislost s progresí a horší prognózou dlaždicových nádorů hlavy a krku (Valach et al., 2012). Bylo zjištěno, že produkce galektinu-1 buňkami stromatu některých nádorů zvyšuje invazivitu nádoru, především budováním imunotolerance aktivním zabíjením T-buněk (He et Baum, 2004).

Expresi galektinu-1 byla ovlivněna přítomností nádorových buněk, v samotných fibroblastech se neobjevila v krátkodobé ani dlouhodobé kultivaci. Již v krátkodobé kultivaci bylo možno pozorovat pozitivní vliv nádorových buněk na tvorbu galektinu-1, a to jak FaDu, tak BLM. V dlouhodobé kultivaci byl u stromálních fibroblastů – méně u S4, výrazněji u ZAM – pozorován pozitivní vliv FaDu na tvorbu galektinu-1. BLM naproti tomu neměly na tvorbu galektinu-1 po 21 dnech žádný vliv ve srovnání se samotnými fibroblasty.

Protein  $\alpha$ -SMA je hlavní komponentou kontraktálního aparátu buněk, běžně používán jako marker formování myofibroblastů (Xing et al., 2010). Takto aktivované fibroblasty ve stromatu nádoru se vyhýbají regulaci vedoucí za běžných podmínek k jejich eliminaci a zůstávají trvale aktivované (Li et al., 2007).

Fibroblasty v tomto pokusu nebyly kultivačními podmínkami s ohledem na expresi  $\alpha$ -SMA téměř ovlivněny. Výsledky ukázaly, že jednotlivé CAFs mají vytvořený svůj fenotyp s určitou tendencí k tvorbě myofibroblastů a nádorové buňky jej nejsou schopny svým vlivem významněji modifikovat. U buněk S4 se nezávisle na kultivačních podmínkách nepodařilo vyvolat expresi  $\alpha$ -SMA, naproti tomu ZAM tvořily myofibroblasty za všech kultivačních podmínek a dlouhodobá kultivace tuto tvorbu ještě zvýraznila. Toto pozorování odpovídá

morfologii ZAM pozorované ve světelném mikroskopu, kde jsou buňky rozprostřené a s výběžky a nevykazují klasickou morfologii fibroblastů jako S4. HF byly určitou výjimkou, myofibroblasty se objevily pouze v kultuře ovlivněné BLM buňkami a pouze v krátkém časovém intervalu.

Při standardní kultivaci tří typů použitých fibroblastů byly pozorovány rozdíly nejen v morfologii, ale i v rychlosti růstu a schopnosti proliferace. Sestavením růstové křivky jak pomocí počítání buněk, tak pomocí stanovení metabolické aktivity bylo sledováno, zda různé typy fibroblastů mají stejný průběh růstové křivky a jakým způsobem ji ovlivní působení nádorových buněk.

V případě HF a S4 byl průběh růstových křivek buněk, rostoucích pod vlivem FaDu a BLM podobný jako u fibroblastů kultivovaných samostatně. Křivky získané počítáním buněk i měřením metabolické aktivity byly ve velmi dobré shodě. V případě zdravých dermálních fibroblastů FaDu stimulovaly růst buněk, zatímco BLM na něj neměly vliv. Stromální fibroblasty S4 rostly za všech podmínek stejně a přítomnost nádorových buněk je nijak neovlivnila. Obě růstové křivky mají podobný průběh a nepatrné rozdíly v pořadí jednotlivých křivek jsou v rámci předpokládané experimentální chyby. Zcela odlišná situace byla u stromálních fibroblastů z melanomu ZAM. Počet buněk v čase se pomalu, ale stále zvyšoval. Počet buněk ZAM rostoucích pod vlivem BLM byl nižší než v případě buněk samotných či pod vlivem FaDu, ale tento rozdíl lze opět zahrnout do experimentální chyby. Naproti tomu průběh křivek sestavených pomocí MTT testu se výrazně liší. Vysoká metabolická aktivita po 48 hodinách ve srovnání s aktivitami HF a S4 je dána tím, že v případě ZAM byl nasazován téměř dvojnásobný počet, neboť jsou to buňky špatně rostoucí a nelze jich nasadit tak málo jako S4 a HF. Po 96 hodinách výrazně vzrostla metabolická aktivita ZAM pod BLM oproti samotným ZAM či ZAM pod FaDu. BLM tedy v téhle fázi dokázaly stimulovat fibroblasty z nádoru, ze kterého pocházejí, k vyšší metabolické aktivitě. Po 168 hodinách ale tato aktivita výrazně poklesla na hodnoty samotných ZAM či ZAM pod FaDu a počty ZAM pod BLM se téměř nezvětšily. Toto pozorování ukazuje na unikátnost chování ZAM, stromálních fibroblastů z melanomu, oproti zdravým dermálním fibroblastům a stromálním fibroblastům ze spinocelulárního karcinomu. Pomalejší růst až téměř jeho zastavení lze do určité míry přisoudit terminální diferenciaci vysokého procenta ZAM v myofibroblasty, které může být ještě podpořeno nádorovými buňkami.



Tvorba sledovaných komponent ECM se u všech tří typů sledovaných fibroblastů měnila s vlivem nádorových buněk. Lze říci, že jednotlivé fibroblasty, kultivované pod vlivem nádorových buněk, si udržovaly v čase konstantní produkci ECM. Velikost této produkce byla dána jak typem fibroblastů, tak i typem nádorové buňky, která je ovlivňovala. Z hlediska tvorby ECM mají tedy nádorové buňky na stromální fibroblasty velký vliv. Jak bylo již zmíněno dříve, komunikace mezi buňkami v nádoru je oboustranná. Indukovaná produkce ECM může mít vliv na další přežívání a invazivitu nádoru a podporu jeho metastazování je jedním z možných terapeutických cílů v budoucí protinádorové léčbě (Nagy et al., 2009).

Linie stromálních fibroblastů vykazují velké rozdíly v základní morfologii a schopnosti tvořit myofibroblasty. Tato vlastnost u nich nebyla nádorovými buňkami ovlivněna a zůstávala stabilní po krátkou i dlouhou dobu kultivace. Vysoká četnost myofibroblastů je spojována s výraznějším invazivním chováním nádoru (De Wever et al., 2008). Pozorování velké četnosti myofibroblastů v případě ZAM oproti S4 se shoduje s předpokladem o vyšší invazivitě melanomu oproti spinocelulárnímu karcinomu.

Studium rozdílů v chování stromálních fibroblastů *in vitro* může přispět k objasnění mechanismů vedoucích k invazi a metastazování nádorů, pochopení rozdílnosti melanomu od kožních nádorů odvozených z dlaždicových epitelů *in vivo* a možnosti jeho terapeutického ovlivnění.

### 5.3. STUDIUM VLIVU RŮZNÝCH NÁDOROVÝCH MELANOCYTŮ NA CAFS Z RŮZNÝCH MELANOMŮ

V rámci diagnostiky melanomu se vyskytuje několik variant tohoto nádoru s různou prognózou. Je také rozeznáváno velké množství faktorů či vlastností daného melanomu, které mají negativní vliv na jeho prognózu (Rigel et al., 2005; Ross, 2006; Shenenberger, 2012).

Je navíc známo, že nestandardní chování melanomů může být s velkou pravděpodobností vysvětlitelné jejich heterogenitou a buněčnou plasticitou. Melanom se může skládat z více subpopulací nádorových buněk, které mohou mít rozdílné vlastnosti, a pouze některé z nich mají atributy kmenových buněk s vyšším potenciálem k agresivitě a invazi. Navíc se zdá, že agresivní fenotyp buněk a heterogenita v rámci nádoru může být

zajištěna i jinými subpopulacemi než nádorovými kmenovými buňkami (Ramgolam et al., 2011).

Předchozí pokusy ukázaly, že nádorové melanocyty izolované z různých druhů nádorů se mezi sebou liší. Výrazně se liší také chování jednotlivých stromálních fibroblastů z různých nádorů. Připravili jsme tedy pokus, který měl ověřit, jak dalece je rozdílné působení různých nádorových i nenádorových melanocytů na stromální a zdravé dermální fibroblasty. Záměrně byly k experimentu vybrány dvě linie CAFs z melanomu, které se podle lišily jak rychlostí růstu v kultuře, tak svou morfologií. V předchozím pokusu se ukázalo, že dalším faktorem, který hraje roli, je čas, byly proto zvoleny dva intervaly kultivace – krátký (11 dní) a dlouhý (21 dní). Sledovaly se znaky, které souvisí s přechodem na myofibroblasty, tvorbou ECM a dále znaky související se zralostí buněk a jejich proliferací.

Ukázalo se, že HF byly kondicionoványi médii z nádorových melanocytů pozitivně ovlivněny k tvorbě fibronektinu, zejména v krátkém časovém intervalu. V dlouhodobé kultivaci tento efekt přetrval pouze v případě KM Asc, u ostatních KM z nádorových melanocytů byl efekt srovnatelný nebo dokonce slabší než při kultivaci v DMEM. MAM hojně produkovaly fibronektin v DMEM a vlivem všech KM nedošlo v krátkodobé kultivaci ke změně množství produkovaného fibronektinu, částečně se pouze lišil vzhled sítí. V dlouhodobém působení ve všech médiích včetně DMEM došlo k výraznému snížení produkce fibronektinu, netvořily se homogenní sítě, ale byla pozorována lokální produkce. V případě KM Asc exprimovaly stromální fibroblasty MAM fibronektin dokonce pouze intracelulárně. ZAM kultivované v DMEM svým chováním připomínaly HF – produkce fibronektinu se s délkou kultivace zvyšovala. S výjimkou krátkodobého působení KM Asc, kdy došlo ke zvýšení tvorby fibronektinu, byla ve všech ostatních případech jeho exprese vlivem KM výrazně snížena až téměř vymizelá. Lze říci, že stromální fibroblasty z melanomu MAM i ZAM reagují na vliv nádorových melanocytů obdobným způsobem, a to snížením produkce v dlouhodobé kultivaci, nehledě na jejich výchozí expresi fibronektinu. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky ovlivňování tvorby ECM získanými ve druhém pokusu (viz výše).

Expresi galektinu-1 za různých podmínek nevykazovala zásadní trendy. Obecně lze říci, že CAFs produkovaly podstatně méně galektinu-1 než zdravé dermální fibroblasty. Je známo, že nádorové stroma je bohaté na galektin-1, který stimuluje neoangiogenezi a metastazaci nádoru. V prostředí melanomu je však galektin-1 produkován zejména nádorovými buňkami

a endotelem (Mathieu et al., 2012), což vysvětluje námi zjištěnou nízkou produkci galektinu-1 stromálními fibroblasty. V dermis v hojící se ráně je galektin-1 také ve velkém množství. Je zde ale produkován keratinocyty a především dermálními fibroblasty (Klíma et al., 2009). HF mají tedy větší tendenci k tvorbě galektinu-1 než stromální fibroblasty.

HF v DMEM při krátkodobé kultivaci ojediněle tvoří myofibroblasty. Tento stav byl u nich podobný i v kondiciovaných médiích s výjimkou KM BLM. V dlouhodobé kultivaci se myofibroblasty objevily zejména pod vlivem KM MelHP, ve všech ostatních kultivacích téměř vymizely. Tento nález je v souladu se skutečností, že nenádorové melanocyty se ve tkáni svým vlivem podílejí na hojení kožních ran a tvorbě jizev. Dokáží ovlivnit jak proliferaci fibroblastů, tak i jejich přechod v myofibroblasty v průběhu hojení (Gao et al., 2013). MAM nebyly schopné v DMEM tvořit myofibroblasty a ani vliv různých nádorových melanocytů tvorbu myofibroblastů nevyvolal. Slabá exprese  $\alpha$ -SMA se objevila pouze v případě krátkodobého vlivu KM Asc, ale v dlouhodobé kultivaci ani v tomto případě myofibroblasty nevznikly. ZAM v DMEM produkují velké množství myofibroblastů. KM z nádorových melanocytů byla schopna ovlivnit tvorbu myofibroblastů a částečně nebo úplně ji omezit. Získané výsledky ukazují, že stromální fibroblasty mají pozměněný fenotyp již z původního nádoru, který může být dán povahou tohoto nádoru. Zdá se, že právě schopnost měnit dlouhodobě zásadním způsobem expresi  $\alpha$ -SMA je nádorovými melanocyty *in vitro* jen těžko pozměnitelná.

Ki-67 je buněčný marker proliferace. Je přítomen ve všech aktivních fázích buněčného cyklu, ale nevyskytuje se v buňkách v  $G_0$  fázi. Ki-67 je schopen určit frakci proliferujících buněk v dané buněčné populaci. Ki-67 index určující frakci Ki-67 pozitivních nádorových buněk je u mnoha maligních nádorů používán jako prognostický faktor pro pacienta (Scholzen et Gerdes, 2000). Ki-67 index je uváděn i pro maligní melanom, exprese Ki-67 se ovšem v tomto případě hledá v nádorových melanocytech (Carlson et al., 2005). Ki-67 označuje jádra buněk, které v krátké době předtím proliferovaly nebo budou proliferovat. Jde tedy více o četnost než o intenzitu pozitivního signálu.

Je nutno poznamenat, že ZAM se mohou jevit jako buňky s nízkým počtem jader pozitivních pro Ki-67. Vysvětlením je ale především to, že ZAM rostou pomaleji, je jich tedy méně a v zorném poli se s jejich pozitivitou setkáme s menší četností. Zásadní je ovšem

sledovat poměr jader pozitivních pro Ki-67 vůči negativním. Ani jedno z kondiciovaných médií nemělo výraznější vliv na proliferaci všech fibroblastů a Ki-67 index zůstal stejný.

Co se týče exprese nestinu, lze u CAFs tento stav srovnat s expresí  $\alpha$ -SMA, kdy ZAM téměř za všech podmínek nestin výrazně exprimují, zatímco MAM jsou při kultivaci v DMEM pozitivní pro nestin jen velmi omezeně, ale jeho expresi v nich mohou částečně vyvolat některá KM.

Napříč všemi znaky byly u jednotlivých fibroblastů pozorovány určité trendy. MAM se projevovaly jako stromální fibroblasty, které lze označit za poměrně inertní, vykazující malé změny fenotypu a odolávající vlivům kondiciovaných médií. Naproti tomu ZAM se ukázaly jako mnohem více plastické buňky, které jsou schopny reagovat markantní změnou exprese na změny kultivačních podmínek.

Pro rozdílnost v chování mezi jednotlivými stromálními fibroblasty pocházejícími z melanomu se nabízí několik vysvětlení. Jak již bylo řečeno výše, melanomy jsou nádory vyznačující se nejednotností v klinické progresi, invazivitě a rychlosti metastatického rozsevu. Experimenty, kde byly indukovány kmenové znaky u rozdílných melanomových linií, potvrdily, že chování buněk z různých melanomů je různé a odpovídá klinicky pozorované progresi nádoru. Je možné, že i nádorové mikroprostředí a buňky, které jsou jeho součástí, se v důsledku toho liší u různých melanomů a odtud vyplývá pozorovaná nejednotnost v chování stromálních fibroblastů. Druhým vysvětlením může být skutečnost poukazující na heterogenitu stromálních buněk objevujících se v rámci jednoho nádoru. Záleží tedy, jaká z populací fibroblastů z nádoru je vyizolována, vlastnosti stromálních fibroblastů se totiž mohou částečně lišit (Sugimoto et al., 2006).

Všechny tyto poznatky vedou k závěru, že pro melanom lze jen těžko najít obecné léčbou ovlivnitelné znaky, tudíž je zde prostor pro personalizovanou terapii.

## **6. ZÁVĚRY**

a) U melanocytů byla pomocí neadhezivního prostředí a vlivu stromálních fibroblastů indukována exprese některých znaků dediferenciace – a to především Oct4, Nanog a CD271. Bylo potvrzeno, že působení stromálních fibroblastů na diferencované nádorové buňky vyvolává expresi markerů kmenových buněk. Jednotná interpretace mezi liniemi je ale obtížná, unikátnost linií odpovídá pozorováním v klinické praxi. Nádorové melanocyty jsou

vysoce plastické, ovlivnitelné působením stromálních fibroblastů i neadhezivního prostředí. Neadhezivní prostředí může simulovat prostředí zakládání metastáz.

b) Nádorové buňky izolované z různých typů nádorů nevykazovaly uniformní působení na fibroblasty, ačkoli v některých případech byl trend změny exprese v jednotlivých fibroblastech pod vlivem nádorových buněk velmi podobný. Fibroblasty vykazovaly plasticitu v závislosti na kultivačních podmínkách pouze v produkci ECM, nikoli v expresi  $\alpha$ -SMA. Rozdíly v produkci ECM mezi jednotlivými CAFs byly dány jejich původním fenotypem, který byl determinován nádorem, ze kterého byly izolovány. Výsledky ukázaly, že vyvolat zásadní změnu tohoto fenotypu pomocí různých kultivačních podmínek je obtížné. Analýza růstu a metabolické aktivity buněk ukázala rozdíly mezi jednotlivými CAFs a skutečnost, že CAFs z melanomu jsou víc senzitivní k vlivu nádorových buněk než CAFs ze spinocelulárního karcinomu, které se více podobaly zdravým dermálním fibroblastům.

c) Výsledky experimentu ukázaly, že každé nádorové melanocyty působily na CAFs z melanomu specifickým způsobem a vyvolávaly u nich rozdílné změny ve všech sledovaných parametrech. Navíc porovnání dvou různých linií CAFs z melanomu ukázalo, že tyto fibroblasty mají zafixovaný jistý fenotyp odvozený z původního nádoru, takže jejich reakce na nádorové melanocyty *in vitro* se výrazně lišila mezi oběma liniemi.

Cíle vytyčené pro diplomovou práci byly splněny. Bohužel se ukázalo, že stejně jako je dobře známá velká variabilita melanomů a jejich těžko předvídatelná reakce na léčbu, tak i v *in vitro* podmínkách je chování jednotlivých nádorových melanocytů i jednotlivých CAFs z melanomu velmi individuální.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Balch, C.M., Murad, T.M., Soong, S.J., Ingalls, A.L., Halpern, N.B., Maddox, W.A. (1978). A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Annals of Surgery* 188, 732–742.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research* 339, 269–280.
- Bellono, N. W., Oancea, E. (2013). UV light phototransduction depolarizes human melanocytes. *Channels* 7, 243–248.
- Bivik, C. A., Larsson, P. K., Kågedal, K. M., Rosdahl, I. K., Ollinger, K. M. (2006). UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *The Journal of Investigative Dermatology* 126, 1119–1127.
- Boiko, A. D., Razorenova, O. V., Rijn, M. Van De, Swetter, S. M., Johnson, D. L., Ly, D. P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., Longaker, M.T., Weissman, I. L. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, 466, 133–137.
- Borrell, A., & Ghislin, S. (2012). Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138, 1145–1154.

- Botchkarev, V.A., Kishimoto, J. (2003). Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. The journal of Investigative Dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research 8, 46-55.
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., Nischt, R. (2013). Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. BioMed Research International 2013, 179784-179800.
- Brenner, M., Hearing, V.J. (2009). What are melanocytes really doing all day long...? : from the ViewPoint of a keratinocyte: Melanocytes – cells with a secret identity and incomparable abilities. Experimental Dermatology 18,799–819.
- Burger, J.A., Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. Blood 107, 1761-1767.
- Carlson, J.A., Ross, J.S., Slominski, A., Linette, G., Mysliborski, J., Hill, J., Mihm, M., Jr. (2005). Molecular diagnostics in melanoma. Journal of the American Academy of Dermatology 52, 743-775.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. Nature 456, 957-961.
- Casey, T.M., Eneman, J., Crocker, A., White, J., Tessitore, J., Stanley, M., Harlow, S., Bunn, J.Y., Weaver, D., Muss, H., Plaut, K. (2008). Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. Breast Cancer Research and Treatment 110, 39-49.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., Tyminska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. Postepy Dermatologii i Alergologii 30, 30-41.
- Cirri, P., Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. American Journal of Cancer Research 1, 482-497.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Research 66, 9339-9344.
- Clawson, G.A., Kimchi, E., Patrick, S.D., Xin, P., Harouaka, R., Zheng, S., Berg, A., Schell, T., Staveley-O'Carroll, K.F., Neves, R.I., Mosca, P.J., Thiboutot, D. (2012). Circulating tumor cells in melanoma patients. PloS One, 7, 41052.
- Cochran, A.J. (2000). The pathologist's role in sentinel lymph node evaluation. Seminars in Nuclear Medicine 30, 11-17.
- Cooper, C.D., Raible, D.W. (2009). Mechanisms for reaching the differentiated state: insights from neural crest derived melanocytes. Seminars in Cell & Developmental Biology 20, 105–110.
- Costin, G.E., Hearing, V.J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. The FASEB Journal 21, 976–94.
- Coulombe, P.A., Kopan, R., Fuchs, E. (1989). Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. The Journal of Cell Biology 109, 2295-2312.
- Crowson, A.N., Magro, C.M., Mihm, M.C. (2006). Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. Modern Pathology 19, 71–87.
- Davar, D., Tarhini, A.A., Kirkwood, J.M. (2011). Adjuvant therapy for melanoma. Cancer Journal 18, 192-202.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer 123, 2229–2238.
- Dvořánková, B., Szabó, P., Lacina, L., Gál, P., Uhrová, J., Zima, T., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.J., Syková, E., Smetana, K., Jr. (2011). Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. Cells, Tissues, Organs 194, 469-480.
- Elder, D.E. (2011). Thin melanoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 135, 342-346.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, A.P., Xu, X., Elder, D.E., Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer Research 65, 9328–9337.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature Reviews Cancer 3, 453-458.

- Flørenes, V.A., Holm, R., Myklebost, O., Lendahl, U., Fodstad, O. (1994). Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Research*, 54, 354–356.
- Franco, O.E., Shaw, A.K., Strand, D.W., Hayward, S.W. (2010). Cancer Associated Fibroblasts in Cancer Pathogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 31-39.
- Fred Brewer, C. (2002). Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 255-262.
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834-842.
- Gao, F., Jin, R., Zhang, L., Zhang, Y. (2013). The contribution of melanocytes to pathological scar formation during wound healing. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 6, 609-613.
- Girouard, S.D., Laga, A.C., Mihm, M.C., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Zhan, Q., Widlund, H.R., Lee, C., Murphy, G.F. (2012). SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Laboratory Investigation* 92, 362-370.
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Reich, R. (2005). Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Letters* 223, 1-10.
- Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, F., McNutt, M.A. (1986). Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *The American Journal of Pathology* 123, 195-203.
- Haass, N.K., Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 10, 153-163.
- Haviv, I., Polyak, K., Qiu, W., Hu, M., Campbell, I. (2009). Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* 8, 589-595.
- He, J., Baum, L.G. (2004). Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 4705–4712.
- Hendrix, J.C.M., Seftor, E.A., Chu, Y., Seftor, R.E.B., Nagle, R.B., McDaniel, K.M., Leong, S.P.L., Yohem, K.H., Leibovitz, A.M., Meyskens, F.L., Jr., Conaway, D.H., Welch, D.R., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W. (1991). Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: Correlation with invasive and metastatic potencial. *Journal of the International Cancer Institute* 84, 165-174.
- Chen, S., Lewallen, M., Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development* 140, 255-265.
- Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Reviews Cancer* 3, 559-570.
- Jinka, R., Kapoor, R., Sistla, P.G., Raj, T.A., Pande, G. (2012). Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers. *International Journal of Cell Biology* 2012, 219196-219204.
- Karagiannis, G.S., Poutahidis, T., Erdman, S.E., Kirsch, R., Riddell, R.H., Diamandis, E.P. (2012). Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Molecular Cancer Research* 10, 1403–1418.
- Kim, M.O., Kim, S.H., Oi, N., Lee, M.H., Yu, D.H., Kim, D.J., Cho, E.J., Bode, A.M., Cho, Y.Y., Bowden, T.G., Dong, Z. (2011). Embryonic stem-cell-preconditioned microenvironment induces loss of cancer cell properties in human melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research* 24, 922-931.
- Klíma, J., Lacina, L., Dvořánková, B., Herrmann, D., Carnwath, J.W., Niemann, H., Kaltner, H., André, S., Motlík, J., Gabius, H.J., Smetana, K., Jr. (2009). Different regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiological Research* 58, 873-884.
- Kodet, O., Dvořánková, B., Krejčí, E., Szabó, P., Dvořák, P., Štork, J., Krajsová, I., Dundr, P., Smetana, K., Jr., Lacina, L. (2013). Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34, 3345-3355.
- Kodet, O. Ústní sdělení. Dermatovenerologická klinika VFN, U Nemocnice 2, Praha 2, dne 10.6.2014
- Kolář, M., Szabó, P., Dvořánková, B., Lacina, L., Gabius, H.J., Strnad, H., Šáchová, J., Vlček, C., Plizák, J., Chovanec, M., Čada, Z., Betka, J., Fík, Z., Pačes, J., Kovářová, H., Motlík, J., Jarkovská, K., Smetana, K., Jr. (2012). Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 104, 738-751.

- Krajsová, I. (2010). Současné trendy a nové možnosti v léčbě melanomu. *Česko-slovenská Dermatologie* 85, 189-195.
- Kulesa, P.M., Kasemeier-Kulesa, J.C., Teddy, J.M., Margaryan, N.V., Seftor, E.A., Seftor, R.E.B., Hendrix, M.J.C. (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3752–3757.
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., Hemminki, K. (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *The Journal of Investigative Dermatology* 122, 342-348.
- Lacina, L., Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Plzák, J., Tachezy, R., Kideryová, L., Kučerová, L., Čada, Z., Bouček, J., Kodet, R., Andre, S., Gabius, H.J. (2007). Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *International Journal of Radiation Biology* 83, 837-848.
- Lade-Keller, J., Riber-Hansen, R., Guldberg, P., Schmidt, H., Hamilton-Dutoit, S. J., Steiniche, T. (2013). E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *The British Journal of Dermatology* 169, 618–28.
- Larue, L., Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443–7454.
- Lee, C.H., Wu, S.B., Hong, C.H., Yu, H.S., and Wei, Y.H. (2013). Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *International Journal of Molecular Science* 14, 6414-6435.
- Lucarz, A., Brand, G. (2007). Current considerations about Merkel cells. *European Journal of Cell Biology* 86, 243–251.
- Lullmann-Rauch, R. (2012). *Histologie, překlad 3. vydání*. Grada, 86-90, 450-460.
- Mathieu, V., de Lassalle, E.M., Toelen, J., Mohr, T., Bellahcene, A., Van Goietsenoven, G., Verschuere, T., Bouzin, C., Debyser, Z., De Vleeschouwer, S., Van Gool, S., Poirier, F., Castronovo, V., Kiss, R., Feron, O. (2012). Galectin-1 in melanoma biology and related neo-angiogenesis processes. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 2245-2254.
- Matta, A., Ralhan, R. (2009). Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck Oncology* 1, 6.
- Midwood, K.S., Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3, 287–310.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., Ganesan, S., Glod, J.V., Banerjee, D. (2008). Carcinoma-Associated Fibroblast – Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Research* 68, 4331–4339.
- Moll, I., Kuhn, C., Moll, R. (1995). Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *Journal of Investigative Dermatology* 104, 910-15.
- Motlík, J., Klíma, J., Dvořánková, B., Smetana, K., Jr. (2007). Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology*, 67, 105–111.
- Nagy, J.A., Chang, S.H., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer* 100, 865–869.
- Ohlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., Sund, M. (2013). Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC cancer* 13, 154.
- Pardali, A., Moustakas, M. (2007). Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1775, 21-65.
- Perego, M., Tortoreto, M., Tragni, G., Mariani, L., Deho, P., Carbone, A., Santinami, M., Patuzzo, R., Mina, P.D., Villa, A., Pratesi, G., Cossa, G., Perego, P., Daidone, M.G., Alison, M.R., Parmiani, G., Rivoltini, L., Castelli, C. (2010). Heterogeneous phenotype of human melanoma cells with in vitro and in vivo features of tumor-initiating cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 1877–1886.
- Plzák, J., Lacina, L., Chovanec, M., Dvořánková, B., Szabó, P., Čada, Z., and Smetana, K., Jr. (2010). Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Research* 30, 455-462.
- Povýšil, C., Štainer, I. (2011). *Obecná patologie*. Grada, 191-202.



- Powell, A.M., Sakuma-Oyama, Y., Oyama, N., Black, M.M. (2005). Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clinical and Experimental Dermatology* 30, 682-687.
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V. (2012). Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie* 35, 49–53.
- Ramgolam, K., Lauriol, J., Lalou, C., Lauden, L., Michel, L., de la Grange, P., Khatib, A., Aoudjit, F., Charron, D., Alcaide-Loridan, C., Al-Daccak, R. (2011). Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One*, 6, 18784.
- Regauer, S., Barrandon, Y., Hospital, M. G. (1990). Epithelial Origin of Cutaneous Anchoring Fibrils 111, 2109–2115.
- Rigel, D.S., Friedman, R.J., Kopf, A.W., Polsky, D. (2005). ABCDE—an evolving concept in the early detection of melanoma. *Archives of Dermatology* 141, 1032-1034.
- Ross, M. I. (2006). Early-stage melanoma: staging criteria and prognostic modeling. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 2312–2319.
- Shenenberger, D.W. (2012). Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. *American Family Physician* 85, 161-168.
- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.
- Schor, S.L., Haggie, J.A., Durning, P., Howell, A., Smith, L., Sellwood, R.A., Crowther, D. (1986). Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer. *International Journal of Cancer* 37, 831-836.
- Schuster, C., Mildner, M., Mairhofer, M., Bauer, W., Fiala, C., Prior, M., Eppel, W., Kolbus, A., Tschachler, E., Stingl, G., Elbe-bürger, A. (2014). Human embryonic epidermis contains a diverse Langerhans cell precursor pool. *Development* 141, 807–815.
- Smalley, K. S. M., Brafford, P., Haass, N. K., Brandner, J. M., Brown, E., Herlyn, M. (2005). Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *The American Journal of Pathology* 166, 1541–54.
- Sober, A.J., Chuang, T.Y., Duvic, M., Farmer, E.R., Grichnik, J.M., Halpern, A.C., Ho, V., Holloway, V., Hood, A.F., Johnson, T.M., Lowery, B. J. (2001). Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45, 579–86.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., Caplan, A.I. (2004). Sitematched papillary and reticular human dermal fibroblast differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology* 200, 134-45.
- Sorrell, J.M., Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science* 117, 667-675.
- Štork, J. (2007). *Dermatovenerologie*. Grada
- Strnad, H., Lacina, L., Kolář, M., Čada, Z., Vlček, C., Dvořánková, B., Betka, J., Plzák, J., Chovanec, M., Šáchová, J., Valach, J., Urbanová, M., Smetana, K., Jr. (2010). Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochemistry and Cell Biology* 133, 201-211.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy* 5, 1640-1646.
- Swetter, A. S. M., Editor, C., Elston, D. M. (2014). Cutaneous Melanoma Workup, 1–12.
- Szabó, P., Kolář, M., Dvořánková, B., Lacina, L., Štork, J., Vlček, C., Strnad, H., Tvrdek, M., Smetana, K., Jr. (2011). Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 103, 233–248.
- Szabó, P., Valach, J., Smetana, K., Jr, Dvořánková, B. (2013). Comparative analysis of IL-8 and CXCL-1 production by normal and cancer stromal fibroblasts. *Folia Biologica* 59, 134-137.
- Szeder, V., Grim, M., Halata, Z., Sieber-Blum, M. (2003). Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Developmental Biology* 253, 258-263.
- Talmadge, J.E., Donkor, M., Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Reviews* 26, 373-400.
- Tarhini, A.A., Gogas, H., Kirkwood, J.M. (2012). IFN- $\alpha$  in the treatment of melanoma. *Journal of Immunology* 189, 3789–3793.

- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Trefzer, U., Schlegel, C., Sterry, W., Späth-Schwalbe, E., Possinger, K., Denkert, C. (1999). Fulminant intravascular disseminating malignant melanoma mimicking acute leukemia. *Blood* 94, 1483–1484.
- Uhr, J.W., Pantel, K. (2011). Controversies in clinical cancer dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12396–12400.
- ÚZIS. (2010) Novotvary 2010 ČR. Cancer Incidence 2010 in the Czech Republic. 1-246.
- Valach, J., Fík, Z., Strnad, H., Chovanec, M., Plzák, J., Čada, Z., Szabó, P., Šáchová, J., Hroudová, M., Urbanová, M., Šteffl, M., Pačes, J., Mazánek, J., Vlček, C., Betka, J., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.J., Kodet, R., Smetana, K., Jr., Gál, P., Kolar, M. (2012). Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *International Journal of Cancer* 131, 2499-2508.
- Van Kilsdonk, J.W., Bergers, M., Van Kempen, L.C., Schalkwijk, J., Swart, G.W. (2010). Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. *Melanoma Research* 20, 372-380.
- Van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R.P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., Orend, G. (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *The International Journal of Developmental Biology* 55, 511-525.
- Wangari-Talbot, J., Chen, S. (2013). Genetics of melanoma. *Frontiers in Genetics* 3, 330.
- Watabe, H., Valencia, J.C., Le Pape, E., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Rouzaud, F., Hoashi, T., Kawa, Y., Mizoguchi, M., Hearing, J.V. (2008). Involvement of Dynein and Spectrin with Early Melanosome Transport and Melanosomal Protein Trafficking. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 162-174.
- Werner, S., Krieg, T., Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology* 127, 998-1008.
- Xing, F., Saidou, J., Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience* 15, 166-179.
- Yamaguchi, Y., Takahashi, K., Zmudzka, B. Z., Kornhauser, A., Miller, S. A, Tadokoro, T., Berens, W., Beer, J.Z., Hearing, V. J. (2006). Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *The FASEB Journal* 20, 1486–1488.
- Ziober, A.F., Falls, E.M., Ziober, B.L. (2006). The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? *Head & Neck* 28, 740-749.